

Laboratorio de reproducción asistida

Paloma Neri Vidaurri,¹ Esperanza Carballo Mondragón,² Francisco Rocha Cárdenas,³ Genaro García Villafañá,⁴ María del Carmen Acuña González,^{3,5} Conrado Emilio Uriá Gómez^{3,6}

En los últimos años, los laboratorios de reproducción asistida experimentaron notables cambios: desde su entorno como parte importante de una clínica de reproducción asistida hasta los mínimos detalles que los componen y la disciplina con la que los embriólogos se deben conducir en ellos.

Los laboratorios deben adaptarse a una serie de requisitos o normas, cambios de metodología en el trabajo y equipos modernos, en donde cualquier cambio o propuesta (incorporación de equipos nuevos, control de las condiciones ambientales, metodologías de trabajo,

medios de cultivo, certificaciones de calidad) tiene que ser documentado; todo con el objetivo de mejorar el servicio y los resultados.

Todos coincidimos en que el diseño y el funcionamiento del laboratorio de reproducción asistida deben innovarse. Hace unos años, el laboratorio de reproducción asistida se concebía dentro de los laboratorios de análisis generales como un apéndice de éstos, donde se tendía a cubrir todo el campo de la reproducción asistida en un solo espacio. Para esos cambios se consideraba que con algunas pequeñas modificaciones se podía aumentar su eficacia y mejorar los resultados. Sin embargo, estos pequeños laboratorios, ya sea por un reducido volumen de trabajo o por motivos puramente físicos, a menudo tuvieron el problema de no incorporar nuevos equipos para ofrecer mejores resultados; algo sustancial para afrontar el presente y, aún más, el futuro en la reproducción asistida y que se debe tener muy en cuenta al montar un laboratorio de reproducción asistida, pensar a futuro en más personal, más equipo, etcétera.¹

Se hace hincapié en que el éxito de una clínica de reproducción asistida específicamente depende del nivel de experiencia del personal médico y de laboratorio. Particularmente, para el personal de laboratorio es necesario el adiestramiento práctico, la educación médica continua en los campos que involucran a la reproducción asistida, la actualización de procedimientos y la implementación de nuevas técnicas, con la participación o asistencia obligada al menos una vez al año a congresos nacionales e internacionales. Todo esto con el único fin de dar a los pacientes todas las alternativas de tratamiento disponibles en el laboratorio de gametos para la obtención de los mejores embriones para transferir.^{1,2}

¹ Centro Especializado en Esterilidad y Reproducción Humana, México, DF.

² Centro Mexicano de Fertilidad Dr. Alberto Kably, Estado de México, México.

³ Embriología y Genética Humana, Biogenrep, Centro Especializado en Genética Reproductiva SC, México, DF.

⁴ Instituto para el Estudio de la Concepción Humana, Monterrey, Nuevo León, México.

⁵ Biotecnología y Biomedicina Molecular, Subdirección de Investigación en Intervenciones Comunitarias, Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, México, DF.

⁶ Citogenética Humana, Laboratorio de Genética Humana, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México.

Correspondencia: Dra. Paloma Neri Vidaurri. Centro Especializado en Esterilidad y Reproducción Humana. Agrarismo 208, primer piso, Torre A, colonia Escandón, CP 11800, México, DF. Correo electrónico: palnevi@ceerh.com.mx

Recibido: septiembre 2013.

Aceptado: octubre 2013.

Este artículo debe citarse como: Neri-Vidaurri P, Carballo-Mondragón E, Rocha-Cárdenas F, García-Villafañá G y col. Laboratorio de reproducción asistida. Reproducción (México) 2013;6:104-127.

www.nietoeditores.com.mx

El trabajo de un embriólogo en un laboratorio de reproducción asistida incluye labores de embriología y andrología; aunque también deben estar implicados en otros aspectos importantes de la clínica, como el tratamiento de los pacientes, el seguimiento folicular, el consejo genético, entre otros. Un embriólogo debe ser responsable, obsesivo en todos los cuidados que debe tener dentro del laboratorio, observador, disciplinado y, sobre todo, requiere muchas habilidades individuales para solucionar cualquier problema que se le presente, su labor más importante es el manejo de gametos y embriones. Por ello, en este equipo generalmente se debe tener mayor consideración en cuanto a su elección, ya que de esto puede depender el éxito del laboratorio. Aunque el equipo del laboratorio de gametos debe estar integrado por un director, supervisor, embriólogo, asistente de embriólogo y técnico, el número del personal actual depende de la cantidad de procedimientos hechos al año.^{2,3}

Las labores del embriólogo, además de incluir todas las tareas posibles, debe mantener un registro total de los estándares del control de calidad, anotando la verificación diaria, pruebas, análisis, así como también llevar un calendario de mantenimiento y limpieza de los equipos y un manual de prevención de accidentes y contingencias dentro del laboratorio.

Actualmente es de vital importancia que un laboratorio de reproducción asistida esté avalado o certificado por una autoridad o sociedad científica, ya sea nacional o internacional, para cerciorarse que se cumplan con los estándares necesarios para un buen funcionamiento del laboratorio.

Se han establecido políticas y procedimientos que permiten evaluar la calidad del laboratorio. Anualmente se debe hacer una estadística, en la que se determinen los mínimos estándares que deben mantenerse continuamente, lo que habla de la calidad del laboratorio.

Gardner³ propone una serie de valores mínimos en los que se debe mantener un laboratorio de reproducción asistida (Cuadro 1).

Cuando un laboratorio obtiene una tasa de embarazo <15%, o realiza mal el control de calidad por parte del laboratorio y no se detectan los posibles errores en el equipo, o la parte clínica hace una mala selección de los pacientes para la fertilización *in vitro*.

Cuadro 1. Estándares mínimos para evaluar la eficiencia de un laboratorio de reproducción asistida

Parámetros analizados	Mínimos estándares
Tasa normal de fertilización	>60%
Tasa de poliespermia	<10%
Tasa de degeneración por ICSI	<15%
Tasa de división embrionaria	>80%
Tasa de supervivencia posdescongelación	>50%
Tasa de embarazo viable	>40%
Tasa de implantación	>20%
Concentración espermática	± 10% del promedio
Morfología espermática	± 2% del promedio
Motilidad espermática	± 10% de promedio

Obviamente, si las condiciones que encuentran los gametos al entrar al laboratorio son adversas, el producto final será de mala calidad. Por ello, debe considerarse al laboratorio un sistema con módulos conectados, a los que es necesario controlar y mejorar. Cualquier laboratorio puede producir embriones que sobrevivirán a las condiciones imperantes, dada su elasticidad intrínseca. Pero sólo el laboratorio que haya optimizado todos los aspectos implicados en la producción *in vitro* logrará obtener embriones de buena calidad asegurando un alto potencial de implantación para desarrollar embarazos viables.

El concepto de optimización de las condiciones del laboratorio de *in vitro* incluye:

- Diseño del laboratorio, ubicación, disposición, tamaño, instalación y materiales.
- Ubicación geográfica.
- Limpieza, orden y distribución de las tareas.
- Material descartable.
- Medios de cultivo.
- Controles de calidad.

Actualmente, entre las evaluaciones para un buen funcionamiento del laboratorio de reproducción asistida se debe considerar la estadística anual de los siguientes datos:

- Grado de madurez ovocitaria.
- Tasa de fertilidad por fecundación *in vitro*.
- Tasa de fertilidad por microinyección intracitoplasmática de espermatozoides.
- Tasa de fallas de fecundación.
- Tasas de embriones pronucleares.

- Tasas de división el día 2 o 3.
- Calidad embrionaria por incubadora.
- Tasas de blastocistos obtenidos.
- Tasas de supervivencia y embarazos.
- Tasas de fecundación.
- Tasas de embarazos por edades, técnicas, afecciones, etc.
- Tasas de implantación.

Decir cómo será la reproducción asistida en el futuro desde el punto de vista del laboratorio no es fácil, aunque en los últimos años los avances más importantes en este campo han sido exactamente en el laboratorio. Posiblemente, el futuro está en la aplicación de una manera más sistemática del diagnóstico genético preimplantacional, apoyando el cultivo de los embriones con medios realmente eficaces, capaces de suministrar todo lo que en verdad necesita el embrión y sin aportar sustancias nocivas para éste. La vitrificación se consolidará como la técnica de congelación más rápida y eficaz, con una metodología que garantice muy buena supervivencia de los embriones y buena tasa de implantación y embarazo, teniendo a los embriones protegidos de las posibles contaminaciones del nitrógeno líquido.

En cuanto a los sistemas de cultivo embrionario, la maduración *in vitro* de ovocitos se debe desarrollar como una de las mejores técnicas, porque desde el punto de vista clínico existen grandes beneficios, como: no hay estimulación ovárica, no hay riesgo de hiperestimulación, la monitorización es más sencilla y el costo es más bajo que el de la fecundación *in vitro* convencional. Puede usarse en casos de ovarios poliquísticos, cuando hay antecedentes de síndrome de hiperestimulación ovárica y como alternativa para las mujeres que no quieren someterse a una estimulación ovárica por algún proceso oncológico, ya que actualmente los resultados son escasos, pues las tasas de implantación y embarazo son bajas y, en cambio, las de aborto son más altas. Además de que en casos muy contados se obtienen embriones para congelar.

Después de todo, el laboratorio de reproducción asistida debe ser el lugar ideal para que un embriólogo aplique todos los conocimientos posibles y haga uso de las mejores técnicas para seleccionar los mejores gametos y para el desarrollo de los mejores embriones, además de trabajar en un ambiente agradable y de ca-

maradería con el área clínica, ya que la comunicación entre ambas partes debe ser vital para la elección del mejor tratamiento. ¿Quién no, como embriólogo de un centro de reproducción asistida, pasó más horas trabajando en el laboratorio que en su casa?, ¿quién no soñó con embriones?, ¿quién no fue al laboratorio en fines de semana y días festivos, ya sea para trabajar o sólo para revisar los embriones? Éste es el perfil y la disciplina de un embriólogo en un laboratorio de reproducción asistida, porque, más que trabajar, ayudamos a generar una nueva vida y nos aseguramos de que todas las parejas reciban el mejor tratamiento posible, de acuerdo con sus necesidades médicas.

De manera particular, agradezco a la Asociación Mexicana de Medicina de la Reproducción el reconocimiento a los embriólogos como parte importante y esencial de una clínica de reproducción asistida, al permitirnos participar en los Tópicos de interés de la Revista Reproducción. Los siguientes subtemas se eligieron con el fin de actualizar a los lectores acerca de los nuevos criterios que se han establecido con base en la evaluación embrionaria gracias a las nuevas técnicas y equipos de observación; acerca del efecto del factor masculino en el desarrollo embrionario, que cada vez está más comprometido no sólo por la morfología sino por la fisiología y la genética del espermatozoide; acerca de los factores genéticos que pueden afectar al desarrollo embrionario hoy en día, cuando se observa una gama de causas multifactoriales por las que una pareja no puede concebir un hijo y, finalmente, de la aplicación de las técnicas ómicas en reproducción asistida, mismas que, aunque algunos investigadores las consideran aún experimentales, permiten importantes hallazgos, sobre todo en la investigación, que ayudan a comprender, por ejemplo, el porqué de muchas fallas de implantación de embriones que transferimos y consideramos potenciales.

REFERENCIAS

1. Alper M, Brinsden P, Fischer R, Wikland M. Is your IVF programme good? Hum Reprod 2002;17:8-10.
2. Gianaroli L, Plachot M, Van Kooij R, Al-Hasani S, et al. ESHRE guidelines for good practice in IVF laboratories.
3. Gardner D, Weissman A, Howles C, Shoham Z, et al. Textbook of assisted reproductive techniques. Laboratory and clinical perspectives. Edit. London. Cap. 1-2.

Consenso de selección embrionaria en un programa de fertilización *in vitro*

Genaro García Villafaña

Instituto para el Estudio de la Concepción Humana.
Av. Hidalgo 1842 Pte., 3er. piso, colonia Obispado, CP 64060,
Monterrey, NL, México.
Correo electrónico: ggarcia67@hotmail.com

Ya pasaron 35 años desde el primer nacimiento por medio de fertilización *in vitro* y durante este tiempo aparecieron infinidad de avances en los tratamientos de reproducción asistida,¹ el principal objetivo era establecer un embarazo viable, con el nacimiento de un bebé único sano.

Los resultados de tratamientos de reproducción asistida dependen de la eficiencia de cada uno de los pasos del procedimiento.

Los conocimientos actuales, en lo que respecta a la estimulación ovárica, la captura ovular y las condiciones de cultivo, así como el mejoramiento de los laboratorios de fecundación *in vitro*, aseguran una tasa de fertilización exitosa y la posibilidad de tener embriones de buena calidad para su transferencia y su criopreservación.¹

Existen numerosos trabajos que demuestran que en un grupo completo de ovocitos obtenidos de una mujer, sólo algunos de ellos son capaces de lograr un embarazo a término. Por esta razón es necesario establecer métodos simples de clasificación que ayuden a seleccionar a los mejores para su transferencia.

Aunque el advenimiento de la genómica, proteómica y metabólica (ómics), tecnología basada en eventos moleculares, puede mejorar la evaluación no invasiva de embriones humanos *in vitro*, todavía no hay evidencia total de que sean técnicas aplicables de manera rutinaria o que haya dispositivos analíticos disponibles para ello; otro punto importante es que el costo de esta tecnología es bastante alto por ahora y, por tanto, los centros de reproducción asistida en todo el mundo eligen embriones para la transferencia en función de su tasa de desarrollo y rasgos morfológicos, evaluados por microscopía de luz. Sin embargo, las diferencias en los criterios de clasifica-

ción de embriones aplicados por centros de reproducción asistida hacen que las comparaciones entre éstas sean desde extremadamente difíciles hasta imposibles.¹

Aunque existen esquemas del consenso nacional en algunos países (por ejemplo, España y el Reino Unido), son relativamente escasos. De manera que el proyecto de formar un consenso internacional de la evaluación de los embriones surge con el propósito de unificar y validar la utilidad de la morfología embrionaria como un punto final en los ensayos clínicos y otros estudios para evaluar nuevas tecnologías para la fecundación *in vitro*.

Entre las sesiones de interés del grupo de biólogos de la reproducción en México es de gran interés conformar un consenso nacional mexicano de la evaluación embrionaria que ayudaría a mejorar los resultados y, sobre todo, a reducir el número de embriones para transferir; con esto disminuirían los embarazos múltiples asegurando la efectividad de los procedimientos en reproducción asistida.

La sociedad Alfa y el Grupo Especial de Interés ESHRE de Embriología, en respuesta a sugerencias y requisitos de los miembros de ambas sociedades internacionales que conciernen la necesidad del consenso internacional en la evaluación morfológica de embriones, realizaron un taller de dos días, impartido el 26 y 27 de febrero de 2011, en Estambul, Turquía.

El objetivo del taller fue establecer criterios comunes y terminologías para clasificar ovocitos, cigotos y embriones que serían manejables para aplicarlos en la rutina de cualquier laboratorio de fecundación *in vitro*, sugiriendo que si los puntos más importantes basados en la calidad de embrión podrían ser definidos y validados, puede ser posible desarrollar y registrar nuevas tecnologías más fácilmente.

Como principal objetivo y justificación del proyecto se reconoció a la Embriología como el punto central de referencia para todos los grupos de intereses especiales y grupos de acción ESHRE y, por tanto, que es necesario realizar un consenso para determinar la manera en la que los embriones deben evaluarse y describirse.

Para trabajar en este consenso se revisaron atlas de Embriología, se usaron imágenes de los ovocitos y del desarrollo embrionario.

El siguiente paso del proyecto fue diseñar un sistema de puntuación de embriones. Una vez logrado esto se revisó el atlas para proporcionar ilustraciones fotográficas para cada uno de los puntos. De esta manera, el sistema de puntuación sería una referencia práctica para todos los embriólogos.

Puntos del consenso

Este trabajo se creó como una primera serie de recomendaciones del consenso para la evaluación de los ovocitos y embriones. Además, debe entenderse que los puntos del consenso designados a evaluar representan las normas mínimas para la clasificación de ovocitos y embriones; de tal manera que no limitan que los laboratorios deban realizar observaciones adicionales por sí mismos.

Las observaciones más frecuentes o prolongadas de ovocitos y embriones conllevan el riesgo (aunque pequeño) de repercusión en su potencial de desarrollo. Por tanto, los embriólogos deben considerar el costo-beneficio de realizar observaciones adicionales, al tiempo que garanticen que éstas se realicen de manera que no se ponga en riesgo el desarrollo del embrión.

Tiempo y reporte de observación de ovocitos fertilizados y embriones

Se acordó que estandarizar el tiempo de las observaciones es fundamental para la comparación de resultados entre diferentes laboratorios y que esto debe ser relativo

al momento de la inseminación (Cuadro 1). De manera uniforme, la evaluación se realizará de acuerdo con el tiempo transcurrido después de ésta o como horas posinseminación.¹

Se observó que hay una inherente variabilidad en la sincronización de todo el proceso biológico y que los tiempos indicados reflejan los tiempos en los que estos procesos se producen en la mayor parte de los casos. Para los embriones se acordó que cada observación tiene dos partes: 1) el número de células y 2) la etapa y grado de desarrollo. Éstos deben ser informados por separado, en asociación con el tiempo, después de la inseminación.²

Clasificación de ovocitos

Fue opinión general del consenso que la óptima morfología de los ovocitos es la de una estructura esférica, cerrada por una zona pelúcida uniforme, con un citoplasma uniforme translúcido, libre de inclusiones, y un cuerpo polar de tamaño apropiado. Se discutió, además, que los ovocitos se someten a la maduración nuclear y citoplasmática y que estos procesos no son los mismos y no necesariamente deben suceder sincronizadamente.¹

Clasificación del complejo ovocito-cúmulo-corona

Fue opinión general del consenso que, a pesar de que en la actualidad hay poca evidencia de una correlación del desarrollo embrionario con el complejo ovocito-cúmulo-corona, es una herramienta importante para la decisión en cuanto a qué técnica utilizar. La manera de realizar

Cuadro 1. Tiempo de observación de ovocitos fertilizados, embriones y el estadio de desarrollo esperado en cada evaluación

<i>Tiempo de observación</i>	<i>Tiempo (horas posinseminación)</i>	<i>Estadio de desarrollo esperado</i>
Fertilización	17 ± 1	Pronúcleos
Singamia	23 ± 1	Esperar que 50% estará en singamia y más de 20% quizás en dos células
División temprana	26 ± 1 post ICSI 28 ± 1 post FIV	Dos células
Valoración embrionaria el día 2	48 ± 1	Cuatro células
Valoración embrionaria el día 3	72 ± 1	Ocho células
Valoración embrionaria el día 4	68 ± 1	Mórula
Valoración embrionaria el día 5	116 ± 1	Blastocisto

Modificado de la referencia 1.

esta evaluación se propone sea un resultado binario; es decir, 0 o 1, en donde 1 es un complejo ovocito-cúmulo-corona bueno, y se define como un cúmulo expandido y una corona radiante bien formada.¹

Clasificación de la zona pelúcida

El consenso no encontró beneficio específico en medir el espesor de la zona pelúcida, ya que se acordó que no hay pruebas suficientes para ningún efecto en el desarrollo embrionario. Sin embargo, se observó que podría haber casos específicos de la paciente, por lo que no se debe descartar una observación sobre todo del color y el grosor de la zona pelúcida.¹

Espacio perivitelino

La presencia de inclusiones en el espacio perivitelino es anómala. Sin embargo, no hay pruebas suficientes en la bibliografía para apoyar cualquier pronóstico específico asociado con esta observación, por lo que el consenso acordó que la observación de inclusiones debe señalarse sin ningún requisito de contarlos o medirlos. Se acordó, además, que una nota del espacio perivitelino sólo debe hacerse si es excepcionalmente grande.¹

Clasificación del cuerpo polar

La presencia o ausencia del primer cuerpo polar debe tenerse en cuenta al visualizarlo en el ovocito siempre que sea posible (teniendo en cuenta que esto es difícil en los ovocitos que son inseminados por fecundación *in vitro*). El tamaño del cuerpo polar sólo se debe tomar en cuenta si es excepcionalmente grande y se sugiere que estos ovocitos no deben ser inseminados, debido al riesgo de aneuploidías en el ovocito.¹

Clasificación del citoplasma

El citoplasma debe ser homogéneo y el que no lo sea puede considerarse de importancia biológica desconocida, ya que la evidencia actual sólo indica que representa una variabilidad entre los ovocitos y no debe considerarse un tipo de dimorfismo que afecte el desarrollo embrionario.¹ El citoplasma puede estar mal definido y es muy diferente de la agrupación de organelos. El citoplasma se puede observar por cualquier forma de microscopia; mientras que la granularidad a menudo se observa por la modulación de contraste de fase y la agrupación de

organelos sí se asocia con menor potencial de implantación.^{1,2} También se acordó que en ocasiones se observan con forma de discos (muy diferentes de las vacuolas) en el citoplasma del ovocito; estos discos demostraron ser un retículo endoplasmático liso y se asocian con riesgo de resultado significativamente anormal.^{1,2} Los ovocitos con estas características no deben ser inseminados.³

Vacuolización

Se acordó que es poco probable que algunas vacuolas pequeñas (5-10 mm de diámetro) sean una consecuencia biológica o de mal pronóstico. Por el contrario, las vacuolas grandes (>14 mm de diámetro) sí se asocian con falla en la fertilización. En ovocitos que son fertilizados con vacuolas se ha observado que éstas persisten aun después de la singamia y pueden interferir con el desarrollo embrionario, lo que resulta en una tasa inferior de recuperación del blastocisto.¹

Revisión de la fertilización

El ovocito fecundado óptimo debe ser esférico y tener dos cuerpos polares, con dos pronúcleos centrales yuxtapuestos, que pueden ser de diferente tamaño, incluso con membranas distintas. Los pronúcleos deben tener número y tamaño equivalentes de cuerpos precursores nucleares, idealmente ecuatoriales y alineados en las membranas yuxtapuestas.¹ Se acordó que el tamaño y la ubicación pronuclear deben evaluarse en el registro de fertilización (Cuadro 2).

Además, las siguientes características deben considerarse severamente atípicas: 1) pronúcleos ampliamente separados y 2) burdamente de tamaño diferentes.

Como parte de la verificación de la fertilización (si se llevó a cabo la fecundación *in vitro*, en lugar de la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides), se debe evaluar la presencia de los discos retículos endoplasmáticos lisos. Normalmente los ovocitos fecundados en los que se observan los discos retículos endoplasmáticos lisos no deben transferirse. También, en la evaluación de la fertilización en ocasiones se observa una translucidez citoplasmática periférica en el ovocito fecundado (un halo); aunque en la actualidad, no hay pruebas suficientes para apoyar un valor pronóstico de su presencia.¹

La decisión de realizar una segunda evaluación el día 1 se encuentra en el margen de la apreciación del

laboratorio, con lo que se puede evaluar la singamia o evaluación de la segmentación temprana (Cuadro 2).^{1,4} El propósito de la segunda evaluación puede ser para control de calidad (singamia) o por razones pronósticas (segmentación temprana), que definirá el tiempo de evaluación seleccionada.

Calificación pronuclear

Se acordó que la calificación pronuclear es de importante valor, ya que puede proporcionar información adicional a la comprobación de fertilización; ambos deben realizarse al mismo tiempo.¹

Se propone que en la calificación pronuclear debe haber tres categorías: simétrica, asimétrica y anormal (Cuadro 2); en esta última se incluyen los pronúcleos anormales sin cuerpos precursores nucleares (pronúcleos fantasma) y los que tienen un pronúcleo.¹

Cuadro 2. Sistema de clasificación de pronúcleos

Calificación	Categoría	Descripción
1	Simétrico	Equivalente Z1 y Z2
2	No simétrico	Otras disposiciones, es particular CPN localizados en la periferia
3	Anormal	Pronúcleos con 0 o 1 CPN

CPN: cuerpos precursores nucleares; Z: Z-score (Scott, 2003). Modificado de la referencia 1.

División embrionaria

Evaluación del número de células

En el consenso se acordaron las etapas importantes a evaluar en el desarrollo embrionario después de la inseminación (Cuadro 1). Al realizar a tiempo todas las evaluaciones se observó que, en promedio, los embriones que mostraron un desarrollo lento tienen un potencial de implantación reducido y que los embriones que se desarrollaron más rápido, lo más probable es que sean anormales y también tengan un potencial de implantación reducido. Lo esperado para el desarrollo del embrión es cuatro células en el día 2 y ocho células en el día 3, en función del tiempo transcurrido después de la inseminación. Sin embargo, esto puede cambiar en el futuro, dependiendo de los medios de cultivo que se utilizarán.¹

Fragmentación

Un fragmento se define como una estructura citoplásmica extracelular unida a la membrana; es decir, <45 µm de diámetro en el día 2 y <40 µm de diámetro en un embrión de día 3. Los grados de fragmentación se definieron como: leve (10%), moderada (10-25%) y grave (>25%). Los valores de porcentaje se basan en los equivalentes celulares, por lo que para un embrión de cuatro células, 25% de fragmentación equivaldría a una de las células en volumen.⁵ Como tal, no existe una definición del efecto de la localización de la fragmentación, ya que esto puede ser un fenómeno dinámico; es decir, los fragmentos pueden moverse dentro del embrión e incluso, desaparecer.^{1,5}

Multinucleación

Se definió como la presencia de más de un núcleo en una blastómera e incluye micronúcleos. El consenso fue que la multinucleación se asocia con disminución del potencial de implantación y que los embriones multinucleados se asocian con mayor nivel de anomalías cromosómicas y, como consecuencia, con aumento del riesgo de aborto espontáneo.^{1,6}

Se acordó que la evaluación de la multinucleación se debe realizar en el día 2 (es decir, 44 horas + 1 hora después de la inseminación) y que la observación de la multinucleación en una sola célula es suficiente para que el embrión sea considerado multinucleado. Los laboratorios deben registrar la incidencia de multinucleación de cada embrión e idealmente el estado de nucleación de cada blastómero en cada embrión en el día 2. Asimismo, se acordó que la evaluación de la multinucleación en el día 3 sería complicada por el tamaño de las células, que son mucho más pequeñas y, por tanto, sería menos fiable. El esquema de clasificación para la multinucleación debe ser binaria y tomar nota de su presencia o ausencia.¹

Tamaño de las células

El sistema de clasificación del tamaño de las células o blastómeras debe ser binario y anotar si todos los tamaños de las células son iguales en cada etapa. Otras características morfológicas, como granularidad citoplasmática, la apariencia de la membrana y la presencia de vacuolas, también pueden determinarse como parte

de la evaluación morfológica de los días 2 y 3. Es importante entender que estas características pueden variar entre los embriones de un paciente a otro.¹

Se discutió si los embriones con aparente desorganización espacial, es decir, los que no tienen la disposición tridimensional esperada de blastómeros, son anormales, pero no hay evidencia concluyente de que así sea.¹

Sistema de calificación de los embriones

Durante el consenso se discutió que el embrión óptimo en el día + 2 (44 ± 1 hora posinseminación) debe tener cuatro células simétricas (del mismo tamaño), mononucleadas, con disposición tetraédrica tridimensional, con <10% de fragmentación y el embrión óptimo en el día +3 debe tener ocho células simétricas (del mismo tamaño), mononucleadas, con <10% de fragmentación (Cuadro 3). El formato de puntuación sería el número de células, el grado y la razón para el grado.¹

Cuadro 3. Consenso del sistema de clasificación para embriones en etapa de división

Grado	Categoría	Descripción
1	Bueno	<10% de fragmentación Simetría celular Sin multinucleación
2	Regular	10-25% de fragmentación Simetría en la mayor parte de las células Sin evidencia de multinucleación
3	Malo	Severa fragmentación (<25%) Sin simetría celular Evidencia de multinucleación

Modificado de la referencia 1.

Evaluación del día + 4 (etapa de mórula)

Un embrión óptimo en día 4 o en estadio de mórula (92 + 2 horas, Cuadro 4) es aquel que puede compactarse y ya entró en la cuarta etapa de división celular. La compactación debe incluir prácticamente todo el volumen del embrión.¹

Evaluación del día +5 (etapa de blastocisto)

Un embrión óptimo en la etapa de desarrollo a blastocisto (116 + 2 horas, Cuadro 5) es aquel que esté totalmente expandido, con una masa celular interna que debe ser prominente, fácilmente visible, que conste de muchas

Cuadro 4. Consenso del sistema de calificación de embriones para el día 4

Grado	Categoría	Descripción
1	Bueno	Entró en la cuarta etapa de división Evidencia de compactación que involucra a todo el volumen del embrión
2	Regular	Entró en la cuarta etapa de división Compactación que involucra a la mayor parte del volumen del embrión
3	Malo	Desproporcionada, compactación que involucra a menos de la mitad del embrión, con dos o tres células que permanecen como blastómeros discretos

Modificado de la referencia 1.

Cuadro 5. Consenso del sistema de calificación de blastocitos

	Grado	Categoría	Descripción
Etapa de desarrollo	1		Temprano
	2		Blastocisto
	3		Expandido
	4		Eclosión/eclosionado
MCI	1	Bueno	Prominente, fácil de identificar, con muchas células compactas y estrechamente adheridas entre sí
	2	Regular	Fácil de identificar, con muchas células que están libremente agrupadas
	3	Malo	Difícil de identificar, con pocas células
TF	1	Bueno	Muchas células que forman epitelio cohesivo
	2	Regular	Pocas células que forman un epitelio malo
	3	Malo	Muy pocas células

Modificado de la referencia 1.

células compactadas, fuertemente adheridas entre sí, y con un trofoblasto que esté conformado por muchas células que formen un epitelio cohesivo. Se acordó que, si bien la masa celular interna tiene un alto valor pronóstico para la implantación y el desarrollo fetal, también el trofoblasto es esencial en el momento de la clasificación embrionaria.^{1,7}

Es común encontrar variantes en la morfología de los embriones, se incluye la existencia de células que se unen por diferentes cadenas citoplasmáticas y tipos

de células y estructuras celulares o acelulares dentro del espacio perivitelino o la cavidad blastocele.^{1,7}

En la evaluación del embrión en estadio de blastocisto se concluyó que el sistema de puntuación debe ser una combinación de la etapa de desarrollo y la calificación final (Cuadro 5).

Se acordó también que la eclosión no puede evaluarse con certeza en embriones con eclosión asistida (con excepción de la brecha abierta durante la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides). Para cada etapa de desarrollo se acordó que la masa celular interna y el trofoblasto deben ser clasificados en relación con la escala de Gardner A-C;¹ pero debe determinarse una calificación de 1 a 3 (en lugar de A-C). La razón de este cambio es para apoyar la entrada de las puntuaciones en bases de datos numéricos y facilitar así el análisis estadístico.^{1,8}

Se observó que si un blastocisto está contraído en el momento de la evaluación, no puede ser clasificado; en este caso debe ser reevaluado una a dos horas más tarde, ya que los ciclos regulares de reexpansión del blastocisto son normales.¹

Definición de un embrión no viable

Fue la opinión de consenso que un embrión no viable es un embrión en el que el desarrollo fue arrestado por lo menos 24 horas; o en los que todas las células se degeneraron o fueron lisadas.¹

CONCLUSIÓN

Se espera que los puntos discutidos en el consenso realizado en Estambul formen un lenguaje común para los embriólogos al describir la morfología de los ovocitos y embriones. Los laboratorios deben analizar otras facetas de la morfología de los ovocitos y embriones, ya

que es un marcador no invasivo que no interfiere en el desarrollo embrionario y esto puede proporcionar en el futuro indicadores de pronóstico. Sin embargo, el uso de un conjunto de datos mínimos comunes establecidos por el sistema de calificación descriptiva, junto con trabajos multicéntricos, nos dará información para mejorar los resultados en nuestra práctica diaria.^{1,9}

REFERENCIAS

1. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting Alpha Scientists in reproductive medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology Human Reproduction, 2011;26:1270-1283.
2. Karsu C, Caglar G, Vicdan K, Sozen E, et al. Smooth endoplasmic reticulum aggregations in all retrieved oocytes causing recurrent multiple anomalies: case report. Fertil Steril 2009;92:1496-1498.
3. Balakier H, Bouman D, Sojecki A, Librach C, et al. Morphological and cytogenetic analysis of human giant oocytes and giant embryos. Hum Reprod 2002;17:2394-2401.
4. Balaban B, Urman B, Isiklar A, Alatas C, et al. The effect of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome. Hum Reprod 2001;16:2357-2361.
5. Antczak M, van Blerkom J. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. Hum Reprod 1999;14:429-447.
6. Balakier H, Cadesky K. The frequency and developmental capability of human embryos containing multinucleated blastomeres. Hum Reprod 1997;12:800-804.
7. Balaban B, Yakin K, Urman B. Randomized comparison of two different blastocyst grading systems. Fertil Steril 2006;85:559-563.
8. Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight- cell stages of preimplantation development. Nature 1988;333:459-461.
9. Cutting R, Morroll D, Roberts SA, Pickering S, et al. Elective single embryo transfer: guidelines for practice British Fertility Society and Association of Clinical Embryologists. Hum Fertil 2008;11:131-146.

Efecto del factor masculino en el desarrollo embrionario

Esperanza Carballo Mondragón

Centro Mexicano de Fertilidad Dr. Alberto Kaby.
Vialidad de la Barranca s/n, consultorio 240. Hospital Ángeles Lomas, Estado de México, México. Correo electrónico: perita_1@yahoo.com

Durante mucho tiempo se pensó que el espermatozoide sólo aportaba el genoma. Actualmente está demostrado que uno de los primeros procesos que ocurre durante la fecundación es el incremento de la concentración

de calcio intracelular, que puede variar durante horas después de la fusión ovocito-espermatozoide. Esta elevación del calcio causa una exocitosis de los gránulos corticales que se localizan en toda la región cortical del ovocito, por debajo de la zona plasmática; estos gránulos contienen enzimas que se esparcen en el espacio perivitelino, modificando su estructura para evitar que otro espermatozoide penetre en la zona (prevención de la poliespermia) formando la membrana de fertilización.

La entrada del espermatozoide también reactiva el ciclo celular del ovocito bloqueado en MII para que concluya la meiosis II, marcando la entrada a la división celular por mitosis. Después de la activación se degrada la proteína MAP cinasa, que mantenía la cromatina condensada del ovocito durante su transición de MI a MII, previniendo la formación de la envoltura nuclear.

Los mayores cambios en el patrón de síntesis de proteínas ocurren durante la activación del ovocito; hay reclutamiento del ARN mensajero materno presente en el citoplasma del ovocito y modificaciones transcripcionales, esenciales para la fertilización y el desarrollo embrionario.¹

La contribución genética que aporta el espermatozoide es de vital importancia para la embriogénesis; pero ésta puede dañarse cuando hay daño al ADN.²

Un daño excesivo al ADN puede, a su vez, dañar la fertilidad del hombre, disminuyendo la capacidad de fertilización, además de tener un efecto negativo en el embrión, lo que predispone a enfermedades genéticas, defectos en el nacimiento y niños con cáncer.²⁻⁴

Además, una de las principales preocupaciones es la posibilidad del aumento de malformaciones con el uso de técnicas de reproducción asistida. En un estudio efectuado en Australia, se encontró una tasa de malformaciones de 6 a 8% en técnicas de reproducción asistida, comparada con la población general, en la que fue de 2 a 3% y mostró mayor asociación con la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides que con la fertilización *in vitro* convencional, lo que es de esperarse, porque con la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides, las muestras seminales tienen mayores alteraciones, encontrándose en varios estudios una asociación entre las malformaciones y la subfertilidad. Asimismo, existen estudios que sugieren aumento en la incidencia de trastornos de impronta genómica que

incluyen el síndrome de Beckwith-Wiedemann y el de Angelman, que son los más asociados con técnicas de reproducción asistida de alta complejidad.^{2,5}

Debido a que los ovocitos son capaces de reparar cierto daño del ADN del espermatozoide, existe cierta confusión en los estudios al tratar de conocer qué tanto aporta el factor masculino al desarrollo embrionario. Si bien no todo se puede corregir, hoy en día hay alternativas de tratamiento para mejorar los resultados y prevenir problemas en las generaciones futuras.^{6,7}

Actualmente, el análisis seminal provee datos básicos, pero muy importantes, para tomar decisiones en cuanto a la capacidad de fertilidad del varón y la posibilidad de tratamiento. Debido a la necesidad de unificación de criterios, en 2010 se presentó el manual de la Organización Mundial de la Salud⁸ relativo a la evaluación seminal, el cual es un instrumento de guía para el mejor conocimiento de las características espermáticas. El análisis de rutina incluye la determinación de características como licuefacción, viscosidad, pH, además de los valores microscópicos, como concentración, movilidad y morfología. Es importante tomar en cuenta el resultado completo; por ejemplo, un volumen bajo, acompañado de ausencia de espermatozoides con un pH bajo, puede indicar ausencia de conductos deferentes.

También se debe tomar en cuenta que el resultado completo proporciona mejor información para tomar decisiones terapéuticas. A pesar de que el análisis seminal básico aporta evidencias importantes, está demostrado que no es suficiente para tener factores de predicción precisos; por lo mismo, es necesario recurrir a estudios alternos que puedan indicar alteraciones que afecten la fertilidad.^{7,8}

Se ha descrito un gran número de mecanismos y moléculas asociados con la función espermática que son útiles para evaluar la capacidad reproductiva, especialmente en lo relativo a la integridad del ADN, el estado de maduración del espermatozoide y la apoptosis. Además, se han encontrado factores de crecimiento y ARN mensajero que pueden dar un nuevo enfoque a la enfermedad y a las opciones de tratamiento. Si bien muchos de estos estudios aún están en investigación, existen algunas pruebas bien establecidas que sirven como estudios alternos para determinar alteraciones específicas.⁷

Otro aspecto importante a considerar siempre, además del análisis seminal, es tener una historia clínica que pueda ser complementada con los estudios básicos y que incluya el estado físico general del varón, índice de masa corporal, edad, estudios hormonales básicos, tabaquismo, antecedentes familiares, hereditarios y personales.⁹

Algo tan simple como el índice de masa corporal proporciona datos importantes en el campo de la reproducción asistida. Aunque el aumento en el IMC en el varón no se ha estudiado de manera extensa, se sabe que conlleva un riesgo de enfermedades metabólicas e hipertensión, así como alteraciones hormonales, disminución de la testosterona, aumento de los estrógenos y alteraciones de las gonadotropinas y de la inhibina B, que es un marcador de la función de las células de Sertoli y, por tanto, de la espermatogénesis. Al mismo tiempo, la cuenta espermática se correlaciona de manera inversa con aumento en el IMC y este efecto es más evidente en casos de obesidad ($>35 \text{ kg/m}^2$) que en casos de sobrepeso.⁹

Por otra parte, se creía que el potencial fértil del hombre se preservaba bien con la edad; sin embargo, las evidencias recientes apoyan el hecho de que con el tiempo hay un aumento en la necrosis, daño en el ADN por apoptosis, disminución de la movilidad progresiva y en la morfología. Con el tiempo, también se afecta la actividad testicular, ya que disminuye la función de las células de Leydig, que lleva a la disminución de la testosterona y al número de espermatogonias tipo A.^{1,10} Este hecho no sólo afecta la fertilidad, sino también aumenta las aneuploidías y el riesgo es igual para hombres de 40 años como para mujeres mayores de 35 años.¹¹

A mayor edad aumenta el tiempo de concepción y la tasa de abortos. Hay estudios que demostraron que el riesgo de muerte fetal es el doble en hombres de 45 años, comparado con hombres de 30 años. Esto tiene sentido, ya que está comprobado que puede haber una disminución de al menos 10% en la fertilización cuando se usan muestras seminales de hombres de más de 39 años, así como reducción en la formación de blastocistos cuando se utilizan muestras seminales de varones mayores de 50 años.³

En nuestra experiencia en inseminación intrauterina, el embarazo disminuye de manera significativa después de los 50 años. En general, varios autores establecieron un punto de alerta a los 40 años.^{1,12}

En la historia clínica puede surgir la necesidad de realizar estudios genéticos. A pesar de que la mayoría de los niños nacidos por técnicas de reproducción asistida son sanos, hay un ligero aumento por microinyección intracitoplasmática de espermatozoides en la prevalencia de aneuploidías en cromosomas sexuales (0.2 a 0.6%) y en anormalidades cromosómicas autosomales (0.04 a 0.07%). La técnica por sí misma no causa estas alteraciones, sino que se deben a que mediante la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides se trata la mayoría de casos con infertilidad masculina.

Estudios genéticos demostraron que durante las fases I y II de la meiosis masculina puede ocurrir la no disyunción, lo que resulta en un complemento cromosómico anormal. El entrecruzamiento en la meiosis es importante porque contribuye a la variabilidad genética y provee la conexión física para la apropiada segregación de los cromosomas. Cada cromosoma bivalente debe contener al menos un sitio de recombinación. En ausencia de entrecruzamiento puede ocurrir una no disyunción. Los cromosomas más pequeños, como el 21 y el 22, tienen mayor frecuencia de aneuploidías. En pacientes subfértiles hay aumento de aneuploidías en los espermatozoides; aparte de que en pacientes con oligozoospermia severa se incrementa la tasa de disomías.^{1,6,13}

Cuando se compararon sondas tradicionales (13, 18, 21, 22, X y Y) se encontró 4% de anormalidades en hombres subfértiles con parámetros seminales anormales, comparado con 1.2% en donadores, y aunque no parece ser muy significativo, el incremento es importante porque las anormalidades cromosómicas son causa de abortos.⁶

Hay que tener especial atención en los pacientes con azoospermia no obstructiva, ya que son quienes tienen mayor incidencia de aneuploidías, especialmente de cromosomas sexuales. Se estableció que aunque las tasas de fertilización pueden ser iguales con azoospermia no obstructiva y azoospermia obstructiva, hay mayores tasas de embarazo y menor tasa de abortos con esta última.^{1,13,14} A pesar de que existen muy buenos resultados con las técnicas de reproducción asistida en pacientes con azoospermia, en azoospermia no obstructiva existe mayor riesgo de transmitir un número anormal de cromosomas a la descendencia, por lo que se sugiere que, de cualquier manera, se realice el diagnóstico genético preimplantacional en estos casos.¹³

En cuanto a las microeliminaciones del cromosoma Y, éstas se asocian más con azoospermia y su prevalencia es de 10 a 15%. Los hombres con este tipo de infertilidad no tienen síntomas obvios, pero el examen físico puede revelar testículos pequeños, criptorquidia o varicocele; incluso existen reportes que sugieren que la delección AZFc, de la región crítica, puede incrementar el riesgo de cáncer testicular. Es básico considerar las eliminaciones en las técnicas de reproducción asistida, ya que éstas se transmiten a los hijos y si bien no afectan la fertilización ni el embarazo, se observó que la misma eliminación puede o no causar infertilidad entre los integrantes de una misma familia; de manera que si el padre es portador, los hijos pueden ser infértiles como él.^{13,14}

El acortamiento anormal de los telómeros es otro evento genético que puede aparecer en la infertilidad masculina, pero en la embriogénesis de modelos animales. En ratones se observó que en cada ciclo de división celular, los telómeros reducen su número de copias, lo que resulta en menor tasa de fertilización, aumento de fragmentación embrionaria, mayor apoptosis en las células embrionarias y menor tasa de blastocistos.⁶

Por otra parte, el estudio del daño del ADN es importante, ya que puede indicar infertilidad inexplicable o idiopática cuando la muestra seminal es normal, en los casos donde no hay evidencia de afección femenina. Se encontró que la falla genómica en el hombre puede deberse a daño en el ADN y que no necesariamente se correlaciona con los parámetros seminales.¹⁴

El uso de espermatozoides con un pequeño daño de ADN puede ser compensado por el ovocito, dependiendo también del grado de alteración. Se demostró que un daño puede ser promutagénico y que las mutaciones generadas durante el proceso de fertilización el ovocito las repara antes de la primera división mitótica. Las mutaciones que ocurren en este punto se fijan en la línea germinal y pueden implicar, entre otros ejemplos, riesgos de infertilidad, niños con cáncer y recién nacidos con enfermedades de impronta genética.^{6,14}

El aumento en el índice de fragmentación del ADN en el espermatozoide afecta el desarrollo embrionario en estadios tempranos con arresto en estadios de seis a ocho células, lo que coincide con la completa activación del genoma embrionario; además de disminución en la tasa

de embarazo, aumento de abortos, falla en la formación de blastocistos y aumento de aneuploidías.^{1,6,13}

No se ha definido un punto de corte en cuanto al porcentaje del índice de fragmentación del ADN debido a la falta de estandarización en las técnicas que se usan actualmente. La probabilidad de embarazo cuando se realiza inseminación intrauterina es de cero cuando hay 30% de daño con ensayo COMETA y 12% con TUNEL; estos niveles también se correlacionan con la falla en la formación de blastocistos cuando se realiza fecundación *in vitro* convencional y microinyección intracitoplasmática de espermatozoides.^{1,14}

Algunos estudios demostraron que es mejor realizar la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides que la fecundación *in vitro* convencional cuando existe daño del ADN en el espermatozoide. Asimismo, se encontró que el índice de fragmentación del ADN es mayor en parejas con pérdida gestacional recurrente que en controles de donadores y población general, se sugiere que 39% de estos abortos pueden predecirse al usar cualquiera de los ensayos para la detección del índice de fragmentación del ADN.

Estudios con niveles de evidencia A y B mostraron que los casos de aumento del índice de fragmentación del ADN se asocian con concentraciones bajas de folato en el plasma seminal. También se demostró que el tratamiento con ácido fólico (5 mg) y fosfato de cinc (66 mg) puede ofrecer una mejoría de, incluso, 74% en la calidad seminal en hombres subfértiles. Por otro lado, se publicó que el tratamiento con 1 g de vitamina C y E al día, durante dos meses, si bien no se ve reflejado en los parámetros seminales básicos, sí trae como consecuencia un aumento en las tasas de embarazo clínico cuando se emplea microinyección intracitoplasmática de espermatozoides, en comparación con placebo.^{10,14}

Además de lo anterior, puede haber un daño al ADN por alteración de las protaminas (P1, P2), esenciales en la maduración espermática, las cuales intervienen en el empaquetamiento de la cromatina. La desproporción entre las protaminas aparece sólo en hombres infértiles, nunca en los fértiles y se asocia con una baja cuenta espermática, disminución de la movilidad, la morfología y aumento del índice de fragmentación del ADN. La insuficiencia de protaminas lleva a mayores niveles de roura del ADN del espermatozoide. Esto causa altera-

ciones epigenéticas de origen paterno que, se cree, dan la medida de autonomía durante la expresión génica del cigoto y tienen un efecto adverso en los eventos del desarrollo embrionario.

Se encontró que una proporción de 0.8 en P1:P2 correlaciona con la disminución de la fertilización y menores tasas de implantación en las técnicas de reproducción asistida. La haploinsuficiencia de P2 en ratones resultó en arresto embrionario después de la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides.^{1,4-6}

En el espermatozoide, las protaminas se reemplazan por histonas nucleares (H2A, H2B, H3 y H4), lo que da como resultado una alta condensación y silenciamiento transcripcional durante la maduración del espermatozoide.

En las espermátides redondas, la estructura de la cromatina es similar a las células somáticas. Durante la espermiogénesis, las histonas nucleares se hiperacetilan y poco después se desmontan y reemplazan por histonas específicas testiculares, que son las proteínas de transición (TP1 y TP2). Al final de la espermiogénesis se remueven las proteínas de transición y toman su lugar las protaminas. En el espermatozoide maduro se reemplaza 85% de las histonas.¹⁵

Las histonas son un factor que contribuye a la transmisión de información epigenética y marca regiones de control de impronta en el ADN durante la formación del espermatozoide.¹⁵

Las histonas son las más aptas para la transmisión de información epigenética porque tienen influencia en las modificaciones de la estructura de la cromatina, que modula el acceso a la maquinaria de patrones de organización de los genes. La impronta se registra por marcadores diferenciales de las regiones de ADN con modificaciones de histonas, metilación o posiblemente por ambos para ayudar a la copia del gen a permanecer activo. La impronta y la metilación del ADN determinan cuáles son los genes del genoma paterno y materno que se expresarán en el embrión, lo que es crítico para el desarrollo normal. Las regiones de impronta del ADN se anulan en el ciclo reproductivo, lo que permite que una nueva impronta se establezca en las células germinales.^{1,4-6}

Cuando se recurre a las técnicas de reproducción asistida puede haber consecuencias negativas cuando

se usan espermatozoides inmaduros, en los que su código epigenético no está bien establecido, lo que causa alteraciones de impronta en los hijos.

Los patrones de impronta en el espermatozoide se modifican durante el paso por el epidídimo, donde la metilación del ADN global del espermatozoide se reduce para prepararse para la fertilización, vía desmetilación pasiva. Después de la remoción de las protaminas en la fertilización, las copias de genes paternos se modifican por una desmetilación activa y subsecuentemente los genes maternos y paternos van a una desmetilación pasiva hasta el estadio de mórula. Después de la implantación, la metilación del genoma embrionario toma lugar y se establece la hipermetilación en la masa celular interna.^{1,5,13}

Aunque es difícil establecer los efectos de la metilación reducida, se encontró evidencia de que ésta puede afectar la embriogénesis, lo que se demostró en muestras seminales normales con metilación reducida empleando técnicas de reproducción asistida, donde se observó que aunque no se afecta la fertilización, sí se reduce la tasa de embarazo. No se sabe si la expresión génica paterna es regulada por metilación en el desarrollo embrionario temprano, por lo que el siguiente paso es entender el efecto paterno de la impronta en los embriones preimplantación e identificar si hay metilación específica de los genes paternos. Para apoyar esto hay estudios que muestran que en los ratones, una alteración en los patrones de metilación en las células germinales se transfiere, a través de la línea germinal paterna, a las siguientes generaciones.^{6,16}

La alteración de los patrones de metilación puede resultar en expresiones bialélicas o represión de genes y puede causar malformaciones; además, más de la mitad de los casos de síndrome de Beckwith-Wiedemann y 10% de síndrome de Angelman se asocian con defectos epigenéticos, y se encuentran con más frecuencia en los casos donde se usó la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides, por lo que se recomienda el uso de secuenciación de microarreglos para analizar los patrones de metilación en hombres infértiles.^{1,13}

Cualquier alteración en las cantidades y composición de los ARN mensajeros del espermatozoide puede indicar anomalías y se demostró que las huellas de ARN mensajeros son diferentes en los pacientes normoespérmicos que en los teratozoospermicos. Estos hallazgos

apoyan la idea de que la alteración en la transcripción durante la espermatogénesis tardía puede afectar la embriogénesis si bien éstos pueden identificarse con microarreglos, pero con la reacción en cadena de la polimerasa se requiere más investigación.^{1,7}

El espermatozoide maduro del eyaculado contiene ARN mensajeros que se clasificaron como residuales de la espermatogénesis, pero recientemente se sugirió que su transferencia durante la fertilización puede tener un significado en la embriogénesis al contribuir al desarrollo correcto de las funciones del embrión, al transmitir la información epigenética. Existe evidencia de que las características fenotípicas del embrión pueden estar influenciadas por ARN mensajero de contribución paterna. Los ARN mensajeros se relacionan con la singamia, con el desarrollo embrionario y existe evidencia de que son necesarios para el desarrollo del cigoto antes de la activación del genoma embrionario.^{1,7,13}

Hay estudios que muestran una reducción temporal y selectiva de ARN mensajero en el ovocito, que puede tener un papel importante en la preservación de la embriogénesis normal, y aporta evidencia adicional de que los ARN mensajeros del espermatozoide pueden tener efectos benéficos en el desarrollo embrionario; además, el hecho de que algunos ARN mensajeros del espermatozoide se encuentran en el cigoto indica que estos transcriptomas pueden ser funcionalmente importantes.^{1,6}

Con respecto al papel del espermatozoide en las primeras fases de la fertilización se encontró que en extractos de espermatozoides de mamíferos hay liberación de calcio (Ca^{+}) debido a un estímulo en la producción de IP_3 , lo que indica que se involucra una proteína fosfolipasa C (PLC) en los mecanismos de señalización, misma que induce variaciones de calcio prolongadas de manera dosis dependiente, lo que incita la activación de los ovocitos.

En cuanto a la activación del ovocito, también se observó que cuando hay un centriolo anormal por parte del espermatozoide, también puede haber falla en la activación, pues el centriolo está implicado en el proceso de fertilización, separación de los cromosomas y en la división celular.^{6,13,17}

Los centrosomas anormales del centriolo pueden estar relacionados con la falla en la unión adecuada de los gametos, lo que causa errores y arresto en el desa-

rollo embrionario. Cuando los espermatozoides son extraídos del testículo antes de su maduración es posible que tengan un centrosoma disfuncional, lo que puede condicionar problemas de segregación de los cromosomas y resultar en embriones con mosaicismo celular y aneuploidías. Se encontró que cuando el centrosoma es defectuoso, esto puede ser causa de abortos.^{5,6}

Durante la fertilización, los centrosomas dan lugar al áster, que provee la organización de los microtúbulos y coordina la posición nuclear de la primera división mitótica, en la que el áster espermático da lugar al centrosoma somático. Se encontró que puede haber incluso 20% de arresto en estadio de pronúcleo por falla en la formación del áster.

La transferencia de centriolos normales a los ovocitos es esencial para una adecuada fertilización, pero si hay malformaciones en el mismo, esto se asocia con fenómenos dañinos no sólo en la fertilización, sino también en la singamia, lo que resulta en arresto de la división. También puede llevar consigo anomalías cromosómicas, causando mosaicismo y aneuploidía en el embrión.^{6,18}

Por lo anterior, se recomienda que cuando se use la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides, se haga una selección del espermatozoide basada también en la morfología de la pieza intermedia. Se demostró que una proporción de >1.5 disminuye la formación del áster, comparada con el control; pero cuando la alteración del centriolo no es tan anormal, los embriones no se arrestan, aunque hay incremento en la tasa de aborto. La globozoospermia es un ejemplo en donde no sólo está afectada la cabeza, sino también tiene esta disfunción del centrosoma.¹⁵

El estudio del factor masculino es muy importante y ya no es posible dejarlo a un lado en el estudio integral de la pareja. Para tener mejores resultados es necesario realizar primero una historia clínica completa, donde se incluyan los estudios básicos; pero, si es el caso, se debe recurrir a las pruebas diagnósticas y al tratamiento médico cuando sea necesario.

Es obligatorio valorar cada paso en la terapéutica de las parejas para tomar decisiones y recordar que la edad es muy importante.

Finalmente, todavía hay mucho por investigar y descubrir en cuanto a diagnóstico y tratamiento, por lo

que debemos estar informados para ofrecer las mejores oportunidades a los pacientes.

REFERENCIAS

1. Nanassy L, Carrell DT. Paternal effects on early embryogenesis. *The J Clin Embryol* 2008;11:9-28.
2. Editorial. Malformation risk in subfertile couples. *Reprod BioMed Online* 2012;25:225-226.
3. Frattarelli JL, Miller KA, Miller BT, Elkind-Hirsch K, et al. Male age negatively impacts embryo development and reproductive outcome in donor oocyte assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril* 2008;90:97-103.
4. Miller D, Brinkworth M, Iles D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 2010;139:287-301.
5. Kobayashi H, Sato A, Otsu E, Hiura H, et al. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Hum Mol Genet* 2007;16:2542-2551.
6. Emery BR, Carrell DT. The effect of epigenetic sperm abnormalities on early embryogenesis. *Asian J Androl* 2006;8:131-142.
7. Garrido N, García-Herrero S, Meseguer M. Assessment of sperm using ARNm microarray technology. *Fertil Steril* 2013;99:1008-1022.
8. WHO. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5ª ed. WHO Press, 2010.
9. Chavarro JE, Toth TL, Wright DL, Meeker JD, et al. Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. *Fertil Steril* 2010;93:2222-2231.
10. De La Rochebrochard E, de Mouzon J, Thépot F, Thonneau P, French National IVF Registry (FIVNAT) association. Fathers over 40 and increased failure to conceive: the lessons of *in vitro* fertilization in France. *Fertil Steril* 2006;85:1420-1424.
11. Escudero T, Abdelhadi I, Sandalinas M, Munne S. Predictive value of sperm fluorescence *in situ* hybridization analysis on the outcome of preimplantation genetic diagnosis for translocations. *Fertil Steril* 2003;79:1528-1534.
12. Carballo ME, Roque A, Durán-Monterrosas LA, Kably AA. El valor de la edad paterna en los resultados de inseminación intrauterina. *Ginecol Obstet Mex* 2013;81:329-333.
13. O'Flynn KL, O'Brien BA, Varghese AC, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: A review. *Fertil Steril* 2010;93:1-12.
14. Esteves SC, Agarwal A. Novel concepts in male infertility. *Inter Braz J Urol* 2011;37: 5-15.
15. Holstein AF, Schulze W, Davidoff M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:107.
16. Sakkas D, Huszar. Paternal effects on reproductive outcome the clinical embryologist 2006;9:23-26.
17. Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, et al. PLC: a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo. *Development* 2002;129:3533-3544.
18. Ugajin T, Terada Y, Hasegawa H, Nabeshima H, et al. The shape of the sperm midpiece in intracytoplasmic morphologically selected sperm injection relates sperm centrosomal function. *J Assist Reprod Genet* 2010; 27:75-81.

Polimorfismos cromosómicos: ¿realmente debemos considerarlos variantes normales?

Francisco Rocha Cárdenas, María del Carmen Acuña González, Conrado Emilio Uriá Gómez
Correspondencia: Francisco Rocha Cárdenas. Biogenrep, Centro Especializado en Genética Reproductiva, SC. Adolfo Prieto 1338, colonia Del Valle, CP 03100, México, DF. Correo electrónico: frocha@biogenrep.com

Cromatina y niveles de compactación del ADN

La integración del conocimiento generado a través de innumerables observaciones microscópicas referentes a la actividad y división celular en eucariontes,^{1,2} de la descripción de la estructura del ácido desoxirribonucleico³ y, recientemente, de la secuencia completa del genoma

humano,⁴ permitieron no sólo entender el mecanismo de duplicación del material genético y su organización nuclear, sino que también dio paso al concepto de la regulación de expresión de genes, que se traduce en el encendido o apagado de los mismos en momentos determinados del desarrollo de un organismo o específicos de un tejido.⁵ Esta regulación genética está mediada a través de complejos multiproteicos que en asociación con el ADN es lo que conocemos como cromatina. La unidad fundamental de la cromatina que confiere un alto grado de compactación al material genético es el nucleosoma, que está constituido por un octámero de histonas (dos

de cada una de las proteínas denominadas H2A, H2B, H3 y H4) y alrededor de éste interaccionan 147 pares de bases de ADN que conforman una fibra de 10 nm. Con la incorporación de una quinta histona, la histona H1, se pasa al nivel superior de compactación, representado por un grupo de seis nucleosomas, llamado solenoide o fibra de 30 nm.

Posteriormente, en su estructura de solenoide se forman asas de cromatina que comprenden decenas de kilobases y que constituyen un cromosoma (Figura 1). Poco se conoce acerca de los aspectos moleculares de compactación entre el solenoide y el nivel superior de compactación, que es el cromosoma en metafase.⁶ No obstante, la evidencia indica que la compactación del ADN desde cromatina a cromosoma ocurre de manera gradual durante la fase G₂ del ciclo celular; mientras que el proceso inverso, la descompactación del ADN, inicia después de la división celular (fase M) y continúa durante la fase G₁ hasta alcanzar de nuevo la condición difusa, que permite la replicación (fase S).⁷ El proceso es dinámico, y por las evidencias bioquímicas y genéticas disponibles, debemos asumir que la estructura de la cromatina, lejos de representar una estructura estática, desempeña un papel bastante dinámico, sobre todo en

lo que se refiere a la transcripción, como veremos a continuación.^{8,9}

Cromatina en interfase: eucromatina y heterocromatina

La fase más larga del ciclo celular, que ocupa casi 90% del ciclo, es la interfase. En este periodo las células, aun cuando permanecen sin dividirse, están en una etapa de alta funcionalidad, puesto que los genes se transcriben y el ADN se replica como preparación para la división. La mayor parte de la cromatina en interfase (alrededor de 90%) se encuentra relativamente sin condensar y distribuida por todo el núcleo (Figura 2). Se le identifica como eucromatina, es la región más rica en genes y al ser más accesible al corte del ADN, por parte de endonucleasas, interactúa con ADN polimerasas, ARN polimerasas y factores de transcripción; en consecuencia, es transcripcionalmente activa.¹⁰ Al contrario de la eucromatina, alrededor de 10% de la cromatina en interfase se encuentra en un estado muy condensado y, por ende, transcripcionalmente inactivo.

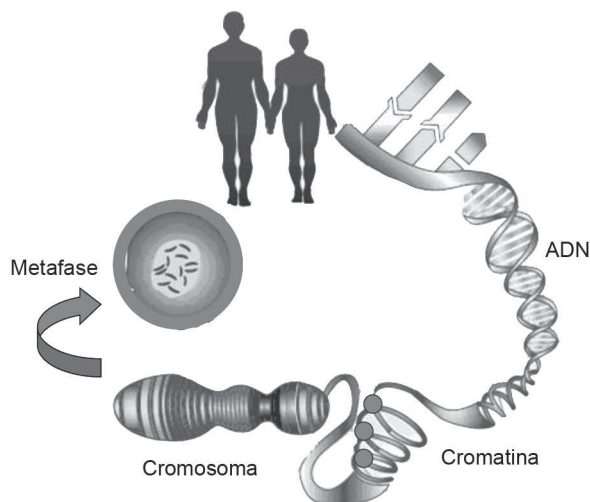


Figura 1. Niveles de compactación del ADN a partir de su estructura de doble hélice, interacción con proteínas para constituir la cromatina y su superenrollamiento hasta alcanzar el grado máximo de compactación, en forma de cromosoma. Modificada de la referencia 41.

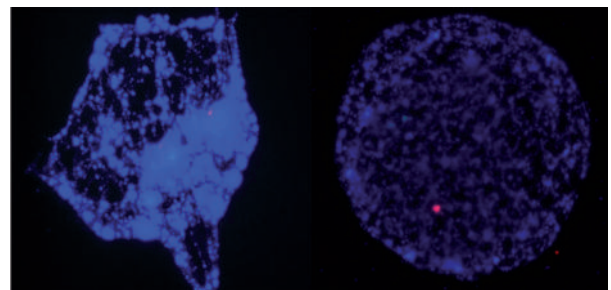


Figura 2. Distribución de cromatina en núcleos de blastómeros de preembriones humanos. Obsérvense las distintas configuraciones que puede adoptar la cromatina en interfase.

Hablamos de la heterocromatina, que se divide en heterocromatina facultativa, que contiene información de algunos genes que no se expresan o que se expresan en algún momento (como el corpúsculo de Barr), y la heterocromatina constitutiva, formada por secuencias de ADN altamente repetitivas y comprimidas, como secuencias satélite, generalmente escasas de genes.¹¹ Esta heterocromatina es altamente polimórfica, quizá debido a la inestabilidad del ADN satélite, y que puede afectar no solamente al tamaño, sino también a su localización,¹²

ya que puede visualizarse en regiones centroméricas y satélite de los cromosomas en metafase.

Cromosomas metafásicos y su estudio

El máximo grado de compactación de la cromatina, en donde el ADN se condensa cerca de 10,000 veces, se alcanza cuando las células entran en mitosis, y adquieren entonces el aspecto típico de los cromosomas metafásicos. Esta cromatina altamente condensada no puede ser utilizada como molde para la síntesis de ácido ribonucleico, de tal manera que la transcripción cesa completamente durante la división celular.¹¹

Bajo condiciones de laboratorio relativamente sencillas^{13,14} es posible obtener preparaciones que permiten observar, a través de microscopía óptica convencional, el alto grado de compactación de la cromatina en metafase (Figura 3). Ello no sólo permitió establecer la dotación cromosómica o cariotipo de distintas especies, incluyendo la humana, sino que además facilitó la detección de poliploidías (tres o más juegos completos de cromosomas) y aneuploidías (ganancia o pérdida de un cromosoma), características de diversas entidades clínicas, como el aborto espontáneo y recurrente, los síndromes de Down, de Edwards, de Patau, de Klinefelter

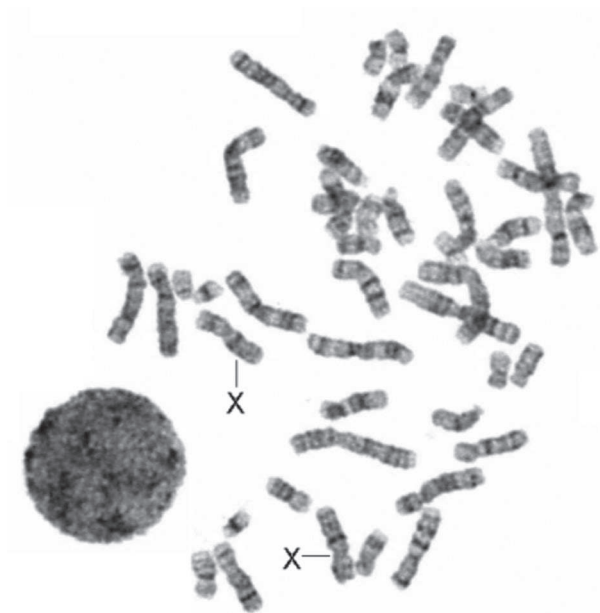


Figura 3. Cromosomas en metafase obtenidos de cultivo de linfocitos de sangre periférica con patrón de bandas G.

y de Turner, entre otros.¹⁵⁻¹⁹ De manera complementaria, con el uso de diferentes tratamientos (desnaturalización con calor o degradación enzimática de la cromatina) y posterior tinción con colorantes específicos para ADN, es posible obtener patrones característicos de bandas claras y oscuras, también con aplicación clínica, ya que permiten la identificación de anomalías estructurales (translocaciones, inversiones y eliminaciones, entre otras), asociadas con pérdida del embarazo, muerte perinatal, malformaciones y retraso mental.²⁰⁻²²

El bandeo de cromosomas no es consecuencia de agrupamientos casuales, sino que está relacionado con la organización estructural del genoma y refleja variaciones como la composición de bases, grado de condensación cromosómica, conformación de la cromatina, secuencias repetitivas y no transcritas.⁷

Polimorfismos cromosómicos: frecuencia y repercusión en la reproducción humana

Los patrones de bandeo de cada cromosoma son prácticamente idénticos en células diferentes y en casi todos los tejidos, pero pueden diferir entre individuos.²³ Estas diferencias se conocen como polimorfismos o variantes cromosómicas y se deben al aumento de la heterocromatina constitutiva. Al menos 9 de los 24 cromosomas humanos tienen variantes en la longitud de ciertos segmentos, principalmente en las regiones centroméricas, constricciones secundarias y satélites. Las más frecuentes suelen implicar a los cromosomas 1, 9, 16 y a los cromosomas acrocéntricos (13, 14, 15, 21, 22 e Y).^{12,24} Figura 4

La incidencia de los polimorfismos cromosómicos se estima en 3.1% en la población general de distintas regiones geográficas;²⁴ desde el punto de vista clínico, aparentemente no tienen un efecto fenotípico.²⁵ No obstante, se pueden transmitir a la descendencia y en años recientes se propuso que podrían estar asociados con la aparición de distintas alteraciones reproductivas, entre ellas, la infertilidad, en la que se documentó que su frecuencia alcanza, incluso, 58.6% en varones infértiles y 28.3% en mujeres infértiles.²⁶

En nuestro centro, durante los últimos tres años, de 263 individuos referidos para cariotipo por infertilidad, la incidencia de polimorfismos heterocromáticos en linfocitos de sangre periférica fue de 12.7% en mujeres

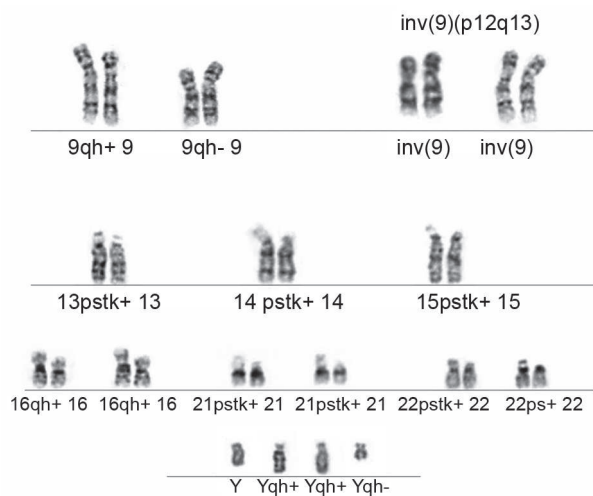


Figura 4. Polimorfismos heterocromáticos visualizados en distintos cromosomas. Se muestran cromosomas normales y sus respectivas variantes. El cromosoma 9 es el que, en nuestra experiencia, tiene más variantes.

y de 29.2% en varones; las variantes del cromosoma 9 son las más frecuentes, seguidas por el aumento de tallos en el brazo corto del cromosoma 21 y por el aumento de la heterocromatina en el brazo largo del cromosoma Y. Hallazgos consistentes con otras poblaciones infértiles estudiadas²⁷⁻²⁹ motivan proponer la realización de estudios prospectivos y multicéntricos con estricto apego a criterios de inclusión/exclusión, tamaños de muestra con amplio poder de prueba estadística, así como valorar el estudio de poblaciones con un mismo origen étnico o geográfico para posteriormente compararlas con otras de distinto origen y de esta manera tener evidencias más contundentes acerca de cómo los polimorfismos cromosómicos pueden repercutir no sólo en la infertilidad, sino también en la aparición de abortos espontáneos y recurrentes, dado que varios estudios también refieren que en estas afecciones, la presencia de variantes cromosómicas en uno o ambos integrantes de la pareja es más frecuente.³⁰⁻³²

Asociación con mala calidad embrionaria e incremento de aneuploidías

Debido a que diversos genes que participan en el desarrollo embrionario se localizan en la heterocromatina,^{33,34} no es nada ilógico pensar que los polimorfismos puedan afectar el comportamiento de embriones generados

mediante técnicas de reproducción asistida. Bajo esta premisa existe un estudio precursor que valora la calidad embrionaria de parejas sometidas a inyección intracitoplasmática de espermatozoides, en donde al menos uno de los integrantes tenía una variante cromosómica en el cariotipo, en comparación con parejas sometidas a la misma técnica, pero con cariotipos normales.²⁹ De los ciclos estudiados, y tras realizar una evaluación de acuerdo con una de las directrices de valoración morfológica más eficientes en la actualidad,³⁵ se observó una diferencia estadísticamente significativa de embriones de mala calidad en pacientes portadores de polimorfismos que en embriones de individuos con cariotipo normal.

Además, y a pesar de que la tasa de aborto no es significativamente mayor en los ciclos con polimorfismos, sí hay una tendencia a su aparición, en comparación con ciclos con cariotipos normales, lo que acaba por reafirmar su posible participación en la pérdida del embarazo.

Finalmente, y complementario a lo anterior, los polimorfismos también pueden incrementar el riesgo de aneuploidías en los gametos y, por ende, en los embriones. Varios estudios demostraron que la existencia de variantes cromosómicas se relaciona con la alteración principalmente de la espermatogénesis, lo que sugiere que podrían tener un efecto en la meiosis.^{27,36,37} En embriones de parejas con polimorfismos heterocromáticos, a los que se realizó biopsia de blastómeras para diagnóstico genético preimplantacional mediante FISH, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de embriones aneuploides, al compararse contra un grupo control (cariotipo normal). También se encontró mayor porcentaje de embriones con haploidías y poliploidías.³⁸

De lo referido, debe insistirse en la importancia de solicitar un estudio citogenético no sólo a cualquier pareja apta para someterse a técnicas de reproducción asistida, sino también a los donantes de gametos. Más aún, debemos tener en cuenta proponer a parejas con polimorfismos cromosómicos la utilidad del diagnóstico genético preimplantacional.

Perspectivas

El desarrollo de métodos de laboratorio asociados con la identificación de modificaciones en la cromatina (acetilación, metilación) y la incorporación de nuevas

tecnologías, como la hibridación genómica comparativa en sus diferentes variantes (convencional, *arrays*, SNPs), permiten el abordaje molecular de los polimorfismos cromosómicos que terminarán, muy probablemente, por demostrar el verdadero papel de los polimorfismos heterocromáticos y su participación en distintas enfermedades, entre ellas las asociadas con la fertilidad humana.^{39,40}

REFERENCIAS

1. Wilson EB. The cell in development and inheritance. 2ª ed. New York: MacMillan, 1900;483.
2. Gilbert SF. Developmental biology. 10ª ed. USA: Sinauer Assoc, 2013;750.
3. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953;171:737-738.
4. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004;431:931-945.
5. Recillas Targa F. La regulación de la cromatina, el switch en el encendido y apagado de genes. Comunicado Academia Mexicana de Ciencias 2013;28 Junio. Disponible en <http://www.comunicacion.amc.edu.mx/comunicados/la-regulacion-de-la-cromatina-el-switch-en-el-encendido-y-apagado-de-genes/>
6. Babbitt GA. Chromatin evolving. *American Scientist* 2011;99:48-55.
7. Luque J, Herráez A. Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. 1ª ed. Madrid: Elsevier, 2006;83-96.
8. Lemon B, Tjian R. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev* 2000;14:2551-2569.
9. Recillas Targa F, Zurita Ortega ME. Control de la expresión genética en eucariontes. En: Jiménez LF, Merchant H, editores. *Biología celular y molecular*. México: Prentice Hall, 2003;63-101.
10. Turner BM. Chromatin and gene regulation: Molecular mechanisms in epigenetics. Great Britain: Blackwell Science, 2001.
11. Cooper GM. La célula. 2ª ed. Madrid: Marbán, 2004;146-154.
12. Mattei MG, Lucini J. Heterochromatin, from chromosome to protein. *Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology*. January 2003. Disponible en <http://atlas-geneticsoncology.org//Deep/HeterochromatineDEEP.html>
13. Smith K. Basic cytogenetic techniques: Culturing, slide making and G banding. En: Celis JE, editor. *Cell biology. A laboratory handbook*. Vol. 3. China: Elsevier Academic Press, 2006;381-386.
14. Contreras Bravo NC, Silva Aldana CT, Mateus Arbelaes HE. *Citogenética aplicada a la medicina*. Bogotá: Universidad del Rosario, 2009.
15. Warburton D, Kline J, Stein Z. Cytogenetic abnormalities in spontaneous abortions of recognized conceptions. In: Porter IH, Willey A, editors. *Perinatal genetics: diagnosis and treatment*. New York: Academic Press, 1986;133.
16. Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2001;2:280-291.
17. Lakovschek IC, Streubel B, Ulm B. Natural outcome of trisomy 13, trisomy 18, and triploidy after prenatal diagnosis. *Am J Med Genet A* 2011;155A:2626-2633.
18. López P, López R, Noriega L, Sepúlveda S. Diagnóstico genético preimplantacional: Análisis de aneuploidías únicas. *An Fac Med* 2013;74:11-14.
19. Acevedo-Gallegos S, García M, Benavides-Serralde A, Camargo-Marín L, et al. Association between selected structural defects and chromosomal abnormalities. *Rev Invest Clin* 2013;65:248-254.
20. Fischer J, Colls P, Escudero T, Munné S. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) improves pregnancy outcome for translocation carriers with a history of recurrent losses. *Fertil Steril* 2010;94:283-289.
21. Rodríguez L, Martínez-Fernández ML, Mansilla E, Mendioroz J, et al. Screening for subtelomeric chromosome alteration in a consecutive series of newborns with congenital defects. *Clin Dysmorphol* 2008;17:5-12.
22. Martínez-Frías ML, Martínez-Fernández ML. A highly specific coding system for structural chromosomal alterations. *Am J Med Genet A* 2013;161A:732-736.
23. Brown T, Robertson FW, Dawson BM, Hanlin SJ, et al. Individual variation of centric heterochromatin in man. *Hum Genet* 1980;55:367-373.
24. Bashin M. Human population cytogenetics: a review. *Int J Hum Genet* 2005;5:83-152.
25. Gardner RJ, Stuhlerland GR. Variant chromosomes and abnormalities of no phenotypic consequence. In: Gardner RJ, Stuhlerland GR, Shaffer, editors. *Chromosome abnormalities and genetic counselling*. USA: Oxford University Press, 2012;257-268.
26. Minocherhomji S, Athalye AS, Madon PF, Kulkarni D, et al. A case-control study identifying chromosomal polymorphic variations as forms of epigenetic alterations associated with the infertility phenotype. *Fertil Steril* 2009;92:88-95.
27. Cortés-Gutiérrez EI, Cerda-Flores RM, Dávila-Rodríguez MI, et al. Chromosomal abnormalities and polymorphisms in Mexican infertile men. *Arch Andrology* 2004;50:261-265.
28. Madon PF, Athalye AS, Parikh FR. Polymorphic variants on chromosomes probable play a significant role in infertility. *Reprod Biomed Online* 2005;11:726-732.
29. Poveda M, Rubio T, Ochando I, Gil L, et al. Las variantes cromosómicas afectan la calidad embrionaria. *Rev Asoc Est Biol Rep* 2010;15:19-23.
30. Dubey S, Chowdhury M, Prahalad B, et al. Cytogenetic causes for recurrent spontaneous abortion—an experience of 742 couples (1484 cases). *Indian J Hum Gen* 2005;11:94-98.
31. Iyer P, Wani L, Joshi S, et al. Cytogenetic investigations in couples with repeated miscarriages and malformed children: report of a novel insertion. *Reproductive BioMedicine Online* 2007;14:314-321.
32. De la Fuente-Cortés BE, Cerda-Flores RM, Dávila-Rodríguez MI, García-Vielma C, et al. Chromosomal abnormalities

- and polymorphic variants in couples with repeated miscarriage in Mexico. *Reprod Biomed Online* 2009;18:543-548.
33. Probst AV, Almouzni G. Pericentric heterochromatin: dynamic organization during early development in mammals. *Differentiation* 2008;76:15-23.
 34. Assou S, Boumela I, Haouzi D, Anahory T, et al. Dynamic changes in gene expression during human early embryo development: from fundamental aspects to clinical applications. *Hum Reprod Update* 2011;17:272-290.
 35. Ardoy M, Calderón G. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. 2ª ed. Madrid: Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción, 2008.
 36. Kayhan Y, Basak B, Bulent U. Is there a possible correlation between chromosomal variants and spermatogenesis? *Int J Urol* 2005;12:984-989.
 37. Rueda J, Moreno JM, Ochando I, Gil L, et al. Chromosome heteromorphisms in infertile couples. *Chromosome Res* 2007;15:35-36.
 38. García-Guixé E, Jiménez-Macedo A, Arjona, Giménez C, et al. Polimorfismos heterocromáticos y riesgo incrementado de aneuploidías en embriones preimplantacionales. *Rev Iberoam Fert Rep Hum* 2010;27:214.
 39. Craig JM, Wong NC. *Epigenetics: A referente manual*. Great Britain: Caister Academic Press, 2011.
 40. Dávila-Rodríguez MI, Cortés Gutiérrez EI, Cerda Flores RM, Pita M, et al. Constitutive heterochromatin polymorphisms in human chromosomes identified by whole comparative genomic hybridization. *Eur J Histochem* 2011;55:28.
 41. Coco R, Arribere R. Nacer Bien. Consideraciones científicas, éticas y legales del inicio de la vida. Buenos Aires: Tiempo editorial, 2005;27.

Técnicas ómicas en reproducción asistida

Paloma Neri Vidaurri

Agrarismo 208, 1er piso, torre A, colonia Escandón, CP 08500, México, DF. Correo electrónico: palnevi@ceerh.com.mx

Hasta hace apenas unos años, los criterios de selección embrionaria se basaban solamente en la morfología del embrión al momento de realizar la transferencia, y dependían, además, del juicio del biólogo, en donde los patrones de alineación de los pronúcleos, la simetría y morfometría de las blastómeras y el desarrollo a blastocisto eran los mejores marcadores para seleccionar a los embriones a transferir; sin embargo, muchas veces los embriones con alineación de pronúcleos, con blastómeras simétricas y sin fragmentos no tenían el potencial de formar un blastocisto, o viceversa. Aun si se llevan los embriones a cultivo prolongado, para una selección más estricta, alrededor de 40% de los blastocistos, con un desarrollo aparentemente normal son cromosómicamente anormales.¹⁻³

La introducción específicamente de las técnicas moleculares, como el diagnóstico genético preimplantacional o la reacción en cadena de la polimerasa, a las técnicas de reproducción asistida hicieron posible el estudio de los

embriones humanos en los primeros días de su desarrollo, antes de la concepción, descubriendo que las aneuploidías son frecuentes en los embriones humanos.^{2,3} Sin embargo, estas técnicas se consideraban invasivas, con riesgo de la viabilidad de los embriones estudiados; además de que se ponía en tela de juicio la eficiencia de la hibridación de las sondas utilizadas, lo que implicó que algunos embriones analizados se calificaran como no informativos para los cromosomas analizados y, por tanto, no se podían seleccionar para la transferencia. Otra situación a discusión son las señales sobrepuestas o cruzadas, pérdidas de señales, múltiple hibridación de las sondas, etcétera; de manera que podrían obtenerse resultados falsos positivos y desecharíamos embriones sanos.^{4,5}

Actualmente, un objetivo común de la selección embrionaria es evitar al máximo la manipulación de los embriones; esto es, que las técnicas de evaluación sean menos invasivas para la selección del mejor embrión, con las mejores posibilidades de implantación, transfiriendo un número menor de embriones y así reducir la incidencia de embarazos múltiples.

Los llamados omics –entre los que están los proteomics y genomics– permiten lograr una mejor selección

embrionaria no invasiva, además de conocer más acerca de los procesos celulares del embrión.⁶

La proteómica es el estudio a gran escala de las proteínas, en particular de su estructura y función (Anderson, 1998 y Blackstock, 1999).⁶ Las proteínas son partes vitales de los organismos vivos, ya que son los componentes principales de las rutas metabólicas de las células. El término proteómica se acuñó en 1997 como una analogía con genómica, el estudio de los genes. La palabra proteoma es la fusión de proteína y genoma y fue acuñada por Marc y Wilkins en 1996, mientras trabajaba en ese concepto como estudiante de doctorado.⁷ El proteoma es la dotación completa de proteínas, incluidas las modificaciones hechas a un conjunto particular de proteínas producidas por un organismo o sistema. Esto varía con el tiempo y con requisitos diferentes, o debido al estrés que sufre una célula o un organismo. La descripción del proteoma permite tener una imagen dinámica de todas las proteínas expresadas, en un momento dado y bajo determinadas condiciones concretas de tiempo y ambiente.

El estudio y comparación sistemáticos del proteoma en diferentes situaciones metabólicas o patológicas permite identificar las proteínas cuya presencia, ausencia o alteración se correlacionan con determinados estadios fisiológicos. Uno de los proyectos globales más desarrollados en este aspecto es el estudio de la maduración ovocitaria *in vitro*. Este tipo de análisis, en el que un amplio rango de proteínas expresadas son investigadas, es esencial para descubrir el uso de biomarcadores del desarrollo y la viabilidad embrionaria.^{8,9}

La proteómica es una ciencia relativamente reciente, desde el desarrollo de esta técnica es definitivamente importante la aplicación de la espectrometría de masas como técnica adjunta al análisis de moléculas biológicas y al crecimiento exponencial en el número de genes o proteínas relacionadas con el potencial embrionario. Esto, combinado con el uso de potentes métodos de fraccionamiento y separación de péptidos y proteínas, como el 2D-PAGE (electroforesis de poliácridamida de dos dimensiones), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la espectrometría de masas con ionización láser (SELDI TOF-MS), permiten consolidar a la proteómica, desde mediados de la década de 1990 del siglo pasado, como ciencia para el análisis masivo de las proteínas.¹⁰

Los primeros hallazgos de la aplicación de la proteómica en embriones permitieron construir y analizar las bases de datos de proteínas de embriones de ratón en la fase de preimplantación.^{11,12} Otro campo es el estudio de los ovocitos criopreservados, en donde su estado se compara con el estudio de ovocitos frescos en MII. La comparación de dos técnicas de criopreservación, vitrificación y congelación lenta reveló que los ovocitos MII vitrificados se parecen a los ovocitos MII en fresco; mientras que los criopreservados en congelación lenta expresaron diferentes patrones de proteínas en regulación ascendente o descendente y estuvieron más presentes en el paso anterior a la siembra, lo que indicó que la exposición crónica al 1,2-propanediol induce cambios fisiológicos en el ovocito.⁹

Del mismo modo, y también con la aplicación de la técnica de Western Blot, se identificó la expresión de proteínas o para detectar modificaciones transcripcionales, relacionadas con el desarrollo del embrión.¹³ Con esta técnica se identificó la proteína MVP (*major vault protein*), que está expresada en embriones porcinos de baja calidad, que no se desarrollaron normalmente *in vitro*.¹⁴ Además, recientemente se utiliza para generar perfiles proteicos en todos los estadios del desarrollo embrionario en mamíferos, observándose diferencias en los perfiles proteicos entre blastocistos tempranos y expandidos, así como entre blastocistos en desarrollo y embriones degenerados.^{15,16} Se reveló que incluso en blastocistos con morfologías similares se observan diferentes patrones de expresión proteica.⁹

Embriones viables, con un proteoma, secretan proteínas al medio de cultivo circundante, contribuyendo potencialmente con el secretoma. En consecuencia, un análisis proteómico no invasivo del secretoma de embriones a lo largo de su desarrollo puede ayudar a revelar los factores secretados que reflejan competencia y viabilidad en el desarrollo.

Un estudio reveló la liberación del factor PAF (1-o-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfolina), soluble, producido y secretado por embriones de mamífero durante su desarrollo; del mismo modo se demostró la presencia de leptina, un pequeño péptido pleiotrópico, en el medio de cultivo de blastocistos en un modelo *in vitro* que estudiaba las interacciones entre el embrión y las células epiteliales endometriales.⁹ También se

demostró que los blastocistos humanos competentes secretaron concentraciones de leptina más altas en el medio circundante que los embriones arrestados. De manera que se planteó la hipótesis de que la leptina secretada por el blastocisto inicia un efecto ligando mediado por receptores de leptina en el endometrio materno, con lo que establece un diálogo molecular durante la ventana de implantación.

De igual manera se demostró que la acrogranina, proteína que regula el crecimiento celular epitelial, es secretada en el medio circundante por embriones de ratón preimplantatorios. Un estudio reportó que una vez que la acrogranina es agregada al medio de cultivo, se promueve la formación de blastocistos, de manera que actúa directamente en las células trofoectodérmicas de forma autocrina.¹⁷

Gracias a la espectrometría de masas se observaron las características distintivas del secretoma embrionario cada 24 horas, desde el momento de la fertilización hasta el estadio de blastocisto, las cuales podrían identificar de manera única lo que ocurre en cada estadio del desarrollo embrionario, independientemente de la morfología; de esta manera se observaron algunas proteínas a lo largo de varios estadios embrionario, mientras que otras fueron estadio-específicas.¹⁸

De manera relevante, al comparar el secretoma de ratón y el humano se reveló que la transición, desde la transcripción hasta las proteínas maternas heredadas, la activación del genoma embrionario y la expresión de proteínas embrionarias clave deben ocurrir para el desarrollo embrionario continuo.¹⁹ Asimismo, se observaron proteínas únicas y específicas en el secretoma embrionario después de la activación del genoma del embrión.¹⁸ Así, los embriones con un genoma activado correctamente y, por tanto, un proteoma y secretoma embrionario completamente funcional pueden tener mayor potencial de competencia de desarrollo.

Otro hallazgo importante fue la participación de la proteína ubiquitina, ya que tiene un papel fundamental y decisivo durante la implantación en mamíferos, mediante el control de las actividades y el recambio de moléculas clave en la señalización.²⁰

La aplicación de las técnicas proteómicas en la reproducción asistida permitió de igual manera realizar una investigación inicial acerca de los embriones

con anomalías cromosómicas, los cuales podrían distinguirse de embriones euploides por medio de su respectivo secretoma; de manera que en un estudio se identificó que blastocistos euploides para 10 cromosomas exhibieron mejores perfiles de secretoma y notablemente diferentes que blastocistos aneuploides para los mismos cromosomas.²¹

Con avances en las técnicas genómicas que permiten un análisis cromosómico exhaustivo de los 23 pares de cromosomas en una célula individual, llegó a ser realista el abordaje ómico integrado.

Además de la tecnología de espectrometría de masas, existen otras plataformas proteómicas en investigación que parecen prometedoras para la investigación del secretoma embrionario humano.

En particular, los microarreglos proteicos tienen la ventaja de ofrecer información complementaria a los estudios del transcriptoma. Recientemente, un estudio que utilizó microarreglos proteicos comparó el medio de cultivo de blastocistos cultivados en grupo con un medio control y reveló el aumento en la expresión del receptor 1 del factor de necrosis tumoral soluble e interleucina 10, la disminución en la expresión de la proteína estimulante de macrófagos alfa, factor de células madre, quimiocina (C-X-C motif) ligando 13 (CXCL13), receptor 3 a ligando inductor de apoptosis relacionado con factor de necrosis tumoral soluble (TRAILR3) y proteína inflamatoria de macrófagos I beta.²²

Un análisis adicional investigó las diferencias entre el medio de cultivo de los blastocistos cultivados en grupo que sí se implantaron *versus* el medio de cultivo de los blastocistos agrupados que no se implantaron y se encontró una disminución significativa de las proteínas CSCL13 y GM-CSF; esta última se encontró en medio de cultivo de blastocistos humanos y de ratón y se observó que promueve el desarrollo embrionario y la implantación al indicar un mecanismo de retroalimentación autocrino para el desarrollo y mantenimiento del blastocisto y su potencial de implantación.²³

Los metabolitos, productos funcionales finales de los procesos biológicos, también se identificaron en investigaciones del secretoma. Se demostró que metabolitos de bajo peso molecular cambian radicalmente para reflejar un estado metabólico y ambiental particular. Se observó que los índices de viabilidad generados a partir

del análisis de medios de cultivos agotados fueron mayores para los embriones humanos que avanzaron para producir embarazos y nacidos vivos, en comparación con los que no se implantaron.^{24,25}

La proteómica y metabolómica son plataformas ómicas complementarias en la investigación del secretoma embrionario humano, prometedoras para el desarrollo de métodos no invasivos de selección de embriones en el campo de la técnicas de reproducción asistida con la capacidad de analizar proteínas y metabolitos en medios de cultivo y de esta manera proponer la viabilidad y potencial implantatorio del embrión.

Junto con la evaluación de la morfología, un método cuantitativo no invasivo de selección embrionaria, se pueden optimizar las transferencias exitosas de embriones individuales, reducir las pérdidas tempranas del embarazo y aumentar la cantidad de nacidos vivos sanos.

La aplicación de las técnicas ómicas en el campo de la reproducción asistida crecen día a día, cuyas investigaciones descubrieron biomarcadores asociados con la viabilidad del ovocito y del embrión y demostraron tener una aplicación importante en algunos estudios clínicos. Los artículos publicados son estudios prospectivos aleatorizados que reportan tasa de embarazo usando esas técnicas solas o en combinación con criterios morfológicos y las comparan con la evaluación embrionaria morfológica convencional, lo que provocó cierta discusión en el medio, recalcando la necesidad de desarrollar una técnica o la combinación de varias que proporcionen un resultado rápido, de bajo costo, fácil de usar y, sobre todo, no invasivo, que pueda aplicarse a corto plazo en la práctica clínica.

REFERENCIAS

1. Elder K and Cohen J. Human preimplantation embryo selection. Informa Healthcare.
2. Delhanty JD, Griffin DK, Handyside AH, Harper J, et al. Detection of aneuploidy and chromosomal mosaicism in human embryos during preimplantation sex determination by fluorescent *in situ* hybridisation (FISH). Hum Mol Genet 1993;2:1183-1185.
3. Angell RR, Aitken RJ, van Look PF, Lumsden MA, et al. Chromosome abnormalities in human embryos after *in vitro* fertilization. Nature 1983;303:336-338.
4. Kuliev A, Verlinsky Y. Preimplantation diagnosis: a realistic option for assisted reproduction and genetic practice. Curr Opin Obstet Gynecol 2005;2:179-183.
5. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. Nature 1990;344:768-770.
6. Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. Electrophoresis 1998;19:1853-1861.
7. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, et al. From proteins to proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. Nature Biotechnology 1996;1:61-65.
8. Hanash SM, Pitteri SJ, Facc VM. Mining the plasma proteome for cancer biomarkers. Nature 2008;452:571-579.
9. Katz-Jaffe MG, Gardner DK. Symposium: Innovative techniques in human embryo viability assessment. Can proteomics help to shape the future of human assisted conception? RBM Online 2008;4:497-501.
10. Weiss W, Görg A. High-resolution two-dimensional electrophoresis. Methods Mol Biol 2009;564:13-32.
11. Latham KE, Garrels JI, Chang C, Solter D. Analysis of embryonic mouse development: construction of a high-resolution, two-dimensional gel protein database. Appl Theor Electrophor 1992;6:163-170.
12. Shi CZ, Collins HW, Garside WT, Buettger CW, et al. Protein databases for compacted eight-cell and blastocyst-stage mouse embryos. Mol Reprod Dev 1994;1:34-47.
13. Navarrete Santos A, Tonack S, Kirstein M, Kietz S, et al. Two insulin-responsive glucose transporter isoforms and the insulin receptor are developmentally expressed in rabbit preimplantation embryos. Reproduction 2004;128:503-516.
14. Sutovsky P, Manandhar G, Laurincik J, Letko J. Expression and proteomic analysis of mammalian preimplantation embryonic development. Reproduction 2005;129:269-282.
15. Katz-Jaffe MG, Linck DW, Schoolcraft WB, Gardner DK. A proteomic analysis of mammalian preimplantation embryonic development. Reproduction 2005;130:899-905.
16. Katz-Jaffe MG, Gardner DK, Schoolcraft WB. Proteomic analysis of individual human embryos to identify novel biomarkers of development and viability. Fert Steril 2006;85:101-107.
17. González RR, Caballero-Campo P, Jasper M, Mercader A, et al. Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by human blastocyst. J Clin Endocrinol Metab 2000;85:4883-4888.
18. Díaz-Cueto L, Stein P, Jacobs A, Schultz RM, et al. Modulation of mouse preimplantation embryo development by acrogranin (epithelin/granulin precursor). Dev Biol 2000;217:406-418.
19. Katz-Jaffe MG, Schoolcraft WB, Gardner DK. Analysis of protein expression (secretome) by human and mouse preimplantation embryos. Fert Steril 2006;86:678-685.
20. Telford NA, Watson AJ, Schultz GA. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian develop-

- ment a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 1990;26:90-100.
21. Wang HM, Zhang X, Qian D, Lin HY, et al. Effect of ubiquitin-proteasome pathway on mouse blastocyst implantation and expression of matrix metalloproteinases-2 and -9. *Biol Reprod* 2004;70:481-487.
 22. Katz-Jaffe MG, Stevens J, Kearns WG, Gardner DK, et al. Relationship between embryonic secretome and chromosomal abnormalities in human IVF. *Fertil Steril* 2006;86:57.
 23. Domínguez F, Gadea B, Esteban FJ, Horcajadas JA, et al. Comparative protein-profile analysis of implanted versus non-implanted human blastocyst. *Hum Reprod* 2008;23:1993-2000.
 24. Robertson SA. GM-CFS regulation of embryo development and pregnancy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007;18:287-298.
 25. Seli E, Sakkas D, Scott R, Kwok SC, et al. Noninvasive metabolomics profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryo in women undergoing *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 2007;88:1350-1357.

Conclusiones

Optimizar la calidad embrionaria para mejorar los resultados de las técnicas de reproducción asistida es uno de los principales objetivos de los centros de reproducción humana y esto es posible gracias al desarrollo de nuevas tecnologías y metodologías que se pueden aplicar en este rubro. Por ejemplo, la mejora y manejo de los gametos antes de la aplicación de una técnica de reproducción asistida, el manejo meticuloso de los embriones resultantes, la gran cantidad de investigaciones acerca de los sistemas de cultivo embrionario (requerimientos metabólicos de los gametos y embriones) y la medicina basada en la evidencia. Porque en este campo, aunque parece que todo está escrito, aún hay muchos detalles de la reproducción asistida que ignoramos.

Una de las principales metas dentro del laboratorio de reproducción asistida es evitar el estrés externo de los gametos y embriones causado por la manipulación, así como el control de factores ambientales e intracelulares influidos por esa manipulación, como el equilibrio osmótico, los cambios de temperatura y fluctuaciones de pH que pueden tener efectos negativos en la calidad embrionaria.

El laboratorio de reproducción asistida y el embriólogo encargado de él constituyen piezas básicas y fundamentales, ya que en el laboratorio se dan las principales investigaciones y avances en el campo de la

infertilidad. Hablar del futuro de la reproducción asistida es tener como objetivo la automatización de los procesos del laboratorio de fecundación *in vitro* y la aportación creciente de la medicina molecular a la medicina clínica actual, no tanto para aumentar las tasas de embarazo (lo cual se incrementó notablemente en los últimos 15 años), sino para hacer más eficientes los tratamientos y lograr mantener las mismas tasas de implantación al transferir dos o tres embriones que hacerlo con un solo embrión con su correcta implantación por tratamiento de reproducción asistida y, por tanto, obtener un solo bebé. Para ello, la medicina molecular tendrá un papel muy importante, que permitirá estudiar un mayor número de genes, conseguir una mayor calidad embrionaria y de recepción endometrial.

Los vertiginosos avances en el campo de la genética, y en general de todos los procesos biológicos implicados en la reproducción humana, permiten la aplicación cada vez más extendida en el diagnóstico y en el tratamiento de la infertilidad.

Para el embriólogo, todo lo anterior se convierte en un reto, ya que con la introducción de nuevas técnicas o metodologías se debe tener mayor atención y concentración, con la creación de sistemas más escrupulosos de control de calidad y un programa de capacitación más estricto.