

ASEBIR

Revista de Embriología Clínica
y Biología de la Reproducción

JUNIO
2021

VOL. 26 Nº1



XI Congreso
ASEBIR
Toledo 2021

SOCIOS POR EL MUNDO

De Colombia a España.
La aventura de Diana
López Castrillón

SOCIOS EMPRENDEDORES

Aïda Casanovas: del
laboratorio al obrador sin
perder de vista la embriología

JÓVENES ASEBIR

Experiencias en
formación como
embriólogo clínico

NOTICIAS

Fotos ganadoras
del Concurso de
fotografía ASEBIR
2021

AULA JOVEN

- Cronología de la edición genética embrionaria
- Neo-ovogénesis y células madre germinales

INNOVACIÓN MERCK/ASEBIR

Inteligencia artificial para la
selección embrionaria

FORMACIÓN CONTINUADA

Catalogación embrionaria
ASEBIR y Time-Lapse

No te pierdas ningún detalle



Microscopio invertido semi-motorizado IX73

- ✓ Flexible
- ✓ Ergonómico
- ✓ Fácil de usar

OLYMPUS SCIENTIFIC SOLUTIONSPara obtener más información, póngase en contacto con infosd.iberia@olympus.es
o visite nuestro sitio web www.olympus-lifescience.com/es/solutions/icsi

ASEBIR

Índice

05 EDITORIAL**06 SOCIOS POR EL MUNDO**

Entrevista con Diana López Castrillón sobre su llegada a España desde Colombia

14 SOCIOS EMPRENDEDORES

Gramola Lab: el obrador de chocolate de la embrióloga Aïda Casanovas Fontanillas

20 AULA JOVEN

- Cronología de la edición genética embrionaria
- Neo-ovogénesis y células madre germinales

39 INNOVACIÓN MERCK- ASEBIR

Inteligencia artificial para la selección embrionaria

49 FORMACIÓN CONTINUADA

Uso de la catalogación embrionaria de ASEBIR y de la tecnología Time-Lapse en los laboratorios de FIV

56 JÓVENES ASEBIR

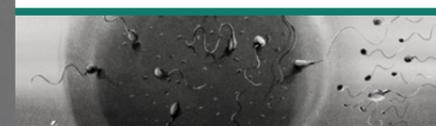
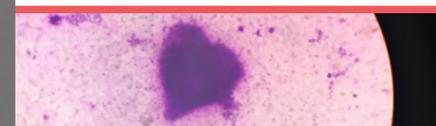
Conoce la experiencia de Irene Cuevas y de varios jóvenes durante las prácticas de embriología clínica

62 CONGRESO ASEBIR 2021

Todo sobre el XI Congreso ASEBIR. Nos vemos en Toledo

68 NOTICIAS

Ganadores del concurso de fotografía 2021



EDITA

Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción

EDITORES Y DIRECTORES CIENTÍFICOS

Laura Mifsud i Elena. Hospital Quirónsalud, Valencia
Beatriz González López De Bustamante. Clínica Nida, Vigo, Pontevedra
Yosu Franco Iriarte. Hospital Ruber Internacional, Madrid

COMITÉ EDITORIAL

Presidente:

Antonio Urries López. Hospital Quirónsalud, Zaragoza

Vicepresidente:

Mark Grossmann i Camps. Barcelona IVF, Barcelona

Secretaría:

Beatriz González López de Bustamante. Clínica Nida, Vigo, Pontevedra

Tesorero:

Nicolás Prados Dodd. IVI Sevilla, S.L., Sevilla

Grupos de Interés:

Belén Buch Tomé. Centro Gutenberg, Málaga
Nicolás Prados Dodd. IVI Sevilla, S.L., Sevilla

Docencia y Formación:

Antonio Alcaide Raya. REPROFIV, Madrid
Cristina Camprubí Sánchez. GenIntegral, Reference Laboratory Genetics, UAB, Barcelona
Francisco Javier Vendrell Montón. Sistemas Genómicos, S. L., Paterna, Valencia

Congresos, Publicaciones e I+D:

Laura Mifsud i Elena. Hospital Quirónsalud, Valencia
Beatriz González López De Bustamante. Clínica Nida, Vigo, Pontevedra
Yosu Franco Iriarte. Hospital Ruber Internacional, Madrid

Tecnología de la información y comunicación:

Abel Gayo Lana. Clínica ERGO, Gijón
Enrique Olaya Vila. VITA Medicina Reproductiva, Elche, Alicante

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

PUBLICIDAD Y COLABORACIONES

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

DISEÑO Y MAQUETACIÓN

Take it Easy Comunicación
Paseo Ruiseñores, 9, 50006 Zaragoza
tiecomunicacion.es · comunicacion@tiecomunicacion.es
Tfno.: 876 64 29 97

Depósito legal: M-18873-1996 | ISSN: 1136-4424

Soporte válido: 78-R-CM

ASEBIR no se responsabiliza de las opiniones vertidas en el contenido de esta revista

EDITORIAL

▶ ANTONIO URRIES LÓPEZ

Presidente de ASEBIR



Ya estamos aquí.

Me resisto a hacer una sola mención más sobre la situación que nos ha tocado vivir. Todos vamos a dejar atrás situaciones que, seguramente, no nos hubiera gustado experimentar, pero es ya el momento de mirar hacia adelante.

Y qué mejor forma de pasar hoja que el volvernos a encontrar el próximo mes de Noviembre en Toledo. Tenemos muchas cosas pendientes que contarnos, abrazos que darnos y cervezas que tomarnos.

Porque de una cosa podéis estar seguros. A pesar de todo, durante este tiempo, vuestro compañero Ramón José Suárez, "Mon", ha seguido trabajando duramente junto con el resto del Comité Científico y el Comité Organizador con la esperanza de un XI Congreso ASEBIR Toledo 2021 presencial: ¡y así va a ser!

Y ya lo tenemos aquí. No hay excusa que valga. Y, además, nos lo merecemos. Así que id organizando vuestras agendas y preparando las maletas porque el 17, 18 y 19 de Noviembre de este año tenemos que encontrarlos todos en la ciudad de El Greco.

Sabemos el alto nivel científico que siempre tienen nuestros Congresos, pero permitirme que en estos momentos priorice la importancia de la "parte social".

Seguro que vamos a aprender mucho de los últimos avances en reproducción asistida, pero aún es más seguro que vamos a disfrutar de volver a vernos todos las caras. Yo el primero.

Es una pena que, posiblemente, no podamos cerrar el círculo con la consecución de nuestro reconocimiento como profesionales sanitarios, pero no vamos a dejar que este traspie propiciado por alguien que "ni sabe ni quiere saber" nos derrote después del compromiso largamente perseguido y recientemente adquirido con el Ministerio de Sanidad. Sabed que seguimos en la lucha.

Pero bueno. No quiero desviarme de lo importante en estos momentos.

Este editorial no lo quiero utilizar para nada más que para deciros que... os esperamos.

Toledo 2021 debe de ser el momento y el lugar de nuestro reencuentro y para demostrar que seguimos aquí con más fuerza si cabe.

Antonio Urries.
Presidente de ASEBIR.



DIANA LUCÍA
López Castrillón

Volvemos a abandonar nuestro continente, cruzando el océano Atlántico para llegar a una socia que nos ha querido contar su amplia experiencia entre dos tierras.

Para esta ocasión contamos con la colaboración de Diana Lucía López Castrillón, que viene con la intención de acercarnos la forma de trabajar de Colombia, en Sudamérica. De su mano conoceremos las peculiaridades de este país, así como su experiencia entre dos países, que han definido su trayectoria y su vida. Conozcámosla.

► ENTREVISTA

ASEBIR: ¡Bienvenida a nuestra sección de Socios por el Mundo, Diana!

Diana Lucía López: ¡Muchísimas gracias, Laura! Y sobre todo mostrar todo mi agradecimiento a ASEBIR por la oportunidad de dar a conocer mi experiencia en este espacio de Socios por el mundo.

ASEBIR: Es un verdadero placer contar con tu colaboración para esta sección. Pero, como siempre, vamos a conocerte primero un poco para que nuestros socios se sitúen. Cuéntanos un poco de ti.

Diana: ¡Claro! Pues soy Diana Lucía López Castrillón, socio de ASEBIR número 1527, tengo 44 años y soy embrióloga desde hace 20 años.

Soy orgullosamente colombiana de nacimiento pero también española de corazón por el gran vínculo afectivo que me une con España, que más adelante les contaré porqué.

ASEBIR: La vida del embriólogo puede dar muchas vueltas que nos aferran a lugares tan lejanos y cercanos a la vez. Háblanos de ti...

Diana: Cierto es, nunca sabemos dónde estará nuestro siguiente lugar. Y en mi caso, nací en Sevilla (Colombia), un pueblo del departamento (lo que en España se conoce como provincia) del Valle del Cauca. Tengo dos hijos, Clara y Juan Pablo, nacidos en Murcia (España), donde tuve oportunidad de cumplir con el ejercicio de esta bella profesión cerca de doce años.

ASEBIR: Aquí llegó el fuerte vínculo a España. (Todos ríen). ¿Y cómo empezó tu trayectoria?

Diana: Pues estudié Bacteriología y Laboratorio Clínico en la Universidad Católica de Manizales en Colombia; más adelante obtuve el título de Biología en la Universidad de Murcia (España), y el Máster en Laboratorio de Reproducción Asistida de la Universitat de València (España) y el Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI).

ASEBIR: ¿Y cómo empezó tu curiosidad por la Reproducción Asistida? ¿Cuál fue tu aliciente?

Diana: Mi interés por el tema de la Reproducción Asistida comienza a finales del año 98, cuando un ginecólogo amigo me habló de fertilidad y los problemas a los que él se enfrentaba en su consulta tratando de ayudar a sus pacientes a embarazarse. Estamos hablando de más de 20 años atrás, momento en el que este campo de la medicina se encontraba casi en sus inicios en mi país, los centros de Reproducción eran escasos, y se carecía de la experiencia y la tecnología para llevar a cabo tratamientos de alta complejidad.

ASEBIR: Todo ha cambiado mucho, a muchos niveles...

Diana: Así, es... y en mi caso, pese al nombre de mi carrera (Bacteriología y laboratorio clínico), no nos dedicamos netamente a las bacterias; en realidad, somos como los analistas del laboratorio, realizamos todo lo que tiene que ver con exámenes de sangre, orina, etc, así que, muy poco tenía esto que ver con la Reproducción, pero me encantó la idea. Comencé a leer, a buscar información sobre fertilidad y poco a poco mi interés fue en aumento, y con ello, el sueño de una formación en el laboratorio de Fecundación in vitro. Empecé a indagar sobre la manera de acceder a una universidad, escuela, clínica, etc. que me permitiera meterme de lleno en el área.

ASEBIR: Había llegado ese gusanillo que todos los embriólogos hemos sentido alguna vez al elegir nuestra profesión, o siquiera pensar en ella.

Diana: ¡Sí! Y es muy curioso como algo hace *clic en tu interior. Y creo que mi destino era cumplir con ese sueño, porque todo se fue dando de la mejor manera posible: los trámites consulares salieron a la primera y la aventura de un largo viaje al otro lado del charco era inminente.

El 23 de Junio me embarqué en un vuelo de doce horas, con dos maletas y el corazón medio roto al despedirme de mis seres más amados. El 24 de Junio aterricé en Madrid y tomé un vuelo a Alicante. Con todo el jolgorio de San Juan, y la alegría propia del verano, España me abrió los brazos, y en ella, el IVI con sede en Murcia.

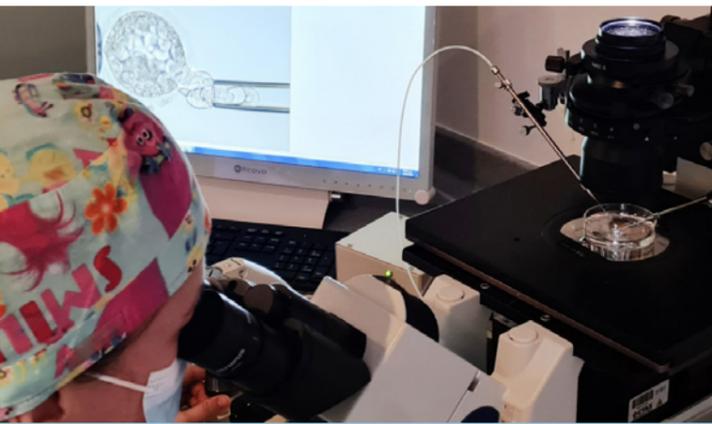
ASEBIR: Y cómo echamos de menos ahora ese jolgorio, ¡bendita vieja normalidad!

Diana: Si, ¡fue muy bonito conocer España en esa circunstancia! Y lo que empezó como una aventura de un año, tiempo que duraba el fellow, se convirtió en un capítulo largo y muy importante de mi vida, ¡¡el más importante quizás!! Doce años de gratas experiencias, de casi echar raíces en España, y de cumplir con muchos de los objetivos que me había propuesto el día que me subí al avión. Casi a punto de terminar en Murcia, necesitaban un biólogo en IVI Almería, me propusieron quedarme y acepté. Aquello fue una experiencia muy enriquecedora, desde todo punto de vista. Y después de dos años regresé a Murcia.

ASEBIR: Imaginamos que ya desde el principio la experiencia fue vertiginosa. País nuevo, costumbres nuevas, gente desconocida que se fue convirtiendo en personas cercanas y familiares.

Diana: Fue una gran oportunidad, que agradezco a Dios y a varias personas cada día. De hecho, como os comentaba al principio, de esa prolongada aventura en España, recibí el mejor de los regalos: mis dos hijos, "murcianos", y por supuesto, todo el conocimiento y experiencia adquiridos en el ejercicio de mi profesión en el IVI, para mi uno de los mejores Centros de Reproducción del mundo.





ASEBIR: Gran centro en nuestro país, y en el mundo, con mejores profesionales si cabe.

Diana: Y nunca me cansaré de dar gracias a todos los que hicieron posible mi presencia y permanencia en el IVI, la lista sería interminable y no puedo nombrarlos aquí a todos, pues el equipo humano de Murcia al completo sigue siendo como mi familia; mis compañeros biólogos, no solo son eso, son también mis amigos y casi mis hermanos. Todos y cada uno en la clínica aportaron de manera importante a mi vida en lo personal y lo profesional. El equipo del laboratorio de FIV en ese momento estaba liderado por Emilio Gómez, a quien envió a diario mis mejores pensamientos y mi gratitud eterna por ser gran profesor, compañero y amigo.

ASEBIR: Nada como una experiencia tan grata para avivar aún más nuestra vocación.

Diana: Totalmente de acuerdo en eso.

ASEBIR: ¿Y cómo surgió la vuelta a Colombia?

Diana: Pues, pese a mi satisfacción en el plano profesional, y de mi comodidad en lo laboral, seguía teniendo un sinsabor y un vacío en cuanto a la ausencia de mi familia, de mis padres principalmente, así que puse las cosas en la balanza y tomé la difícil decisión de regresar a mi tierra. A muchos les parecía una locura. Muchos quieren estar allí en España, y yo teniendo aquello, quería volver. Pero en realidad hay cosas que el dinero y el estatus profesional no compensan, al menos así lo veo yo.

Dejar atrás todo lo que había construido en España, volver a empezar en Colombia, con dos hijos, enfrentar un proceso de readaptación, no parecía coherente.

ASEBIR: En ocasiones la coherencia no es necesariamente la mejor opción y arriesgando es como se consiguen nuevas experiencias y vivencias personales únicas.

Diana: En efecto, de hecho, aquí todo es diferente, y sabía que en el plano laboral también lo sería.

ASEBIR: Y exactamente, ¿a qué parte de Colombia nos trasladamos para conocer tu experiencia allí?

Diana: Pues la ciudad elegida fue Cali, una ciudad de casi 2,3 millones de habitantes, capital del departamento del Valle del Cauca, ubicada al sur del país, en la región del Pacífico colombiano. Con un clima clasificado como tropical y una temperatura promedio de 25°C, se convierte en un atractivo lugar para aquellos que huimos del frío (jeje).

ASEBIR: Umhh, interesante dato, ¡jajaja!

(Todos ríen).

ASEBIR: Imaginamos que tras la larga estancia en España, el cambio se hizo notable.

Diana: Obviamente, al regresar a Colombia, concretamente a Cali, como comentábamos, noté el cambio, como era de esperar, pero en el plano personal fue fácil volverme a acostumbrar. Solo destacaría el impacto visual que tenía vivir en una ciudad con un caos vehicular y de orden público importante, más vendedores ambulantes, y lastimosamente más mendicidad. Pero bueno, como se suele decir, ¡es lo que hay!

ASEBIR: ¿Y cómo fue en el terreno laboral?

Diana: En la parte laboral, lo primero con lo que me impacté, fue con un volumen de trabajo muy bajo comparado con lo que estaba acostumbrada a tener en España. De un lugar en el que teníamos, en aquel entonces, un promedio 1000 ciclos al año y un ritmo en general acelerado, pasé a un ritmo extremadamente pausado, con unos 170 ciclos anuales, y eso al principio me costó mucho.

ASEBIR: Dato curioso teniendo en cuenta la gran diferencia de población entre las tres ciudades.

Diana: Sí, de hecho, en Colombia desde siempre ha existido como una especie de meseta en el número de ciclos de FIV, y no conseguimos superar los 4000 ciclos por año a nivel nacional. ¿El porqué? Es un total misterio sin resolver.

ASEBIR: Imaginamos que habrá ciertas razones para este suceso, cuanto si no, curioso como decíamos.

Diana: Pues se barajan varias teorías por lo que pude comentar con algunos ginecólogos del área, pero en definitiva, la hipótesis más aceptada es la economía, el nivel de vida. Es increíble que todo un país, con 50 millones de habitantes realice casi lo que se hace en un centro grande de Valencia o Madrid.

Una economía desequilibrada y un índice de desempleo en aumento, hacen poco accesibles los tratamientos de reproducción por sus costes elevados.

ASEBIR: ¿Y no cubre, aunque sea parte del proceso, las compañías aseguradoras o la sanidad pública?

Diana: ¡Qué va! Estos tratamientos no están cubiertos ni por pólizas de salud, ni por medicina prepagada, y mucho menos por la seguridad social. Así que hacerlos de manera particular, es algo que no muchos se pueden permitir. Con todo y eso, la Reproducción Asistida se mantiene; cada vez aparecen nuevas clínicas, sobre todo en Bogotá, la capital, y seguimos en lo mismo de siempre, no hay aumento significativo, y todo se reparte.

Desde hace varios años, se teje un proyecto de ley en el senado para subsidiar los tratamientos de FIV a través de la seguridad social, pero no hay nada concreto aún. En mi opinión, es cuestión de cómo cada centro se mueva, se oferte y se mercadee, hay estrategias que pueden funcionar bien para atraer a más pacientes, ¡¡como en todo sitio!!

ASEBIR: E imaginamos que la situación que vivimos actualmente, no ha hecho más que empeorar las cosas, ¿no?

Diana: El pasado 2020, con la llegada de la pandemia, ese número seguro bajó. Casi todos los centros estuvimos cerrados cerca de un par de meses. La COVID 19 ha causado estragos en todo el mundo, y aquí no ha sido la excepción. Las medidas de confinamiento establecidas por el Gobierno a finales de marzo del año pasado nos llevaron al cese de actividad, y a finales de mayo retomamos poco a poco, teniendo como guía las conductas establecidas por las sociedades americana y europea.

Se nos permitió la realización de ciclos de FIV con congelación embrionaria, y con algunas excepciones de transferencia según el caso, previa firma de consentimientos y pruebas de PCR COVID antes de la estimulación y de nuevo antes de la punción. A pesar de lo que parecía, que iba a ser un año con muy pocos ciclos, logramos remontar y tuvimos 50 menos que el año anterior, así que no nos podemos quejar.

ASEBIR: Aquí pasó una situación bastante similar, de alguna forma, se remontaron los ciclos "perdidos" en los meses de parada. Y cuéntenos, ¿cómo es la forma de trabajar allí? ¿Alguna diferencia notable técnicamente hablando?

Diana: En cuanto a la parte técnica y la forma de trabajar, no hay demasiada diferencia en las técnicas: una ICSI es una ICSI aquí y en la Patagonia. Además, muchos de los infertólogos y biólogos aquí han hecho al menos una pasantía en Reproducción por España.

ASEBIR: Y por concretar, cuéntenos alguna cosa más de tu centro de trabajo. ¿Dónde se encuentra exactamente Diana?

Diana: ¡Jajaja! ¡Es verdad, que no lo hemos comentado!

Pues actualmente soy embrióloga del laboratorio de Fecundación in vitro en la Clínica Imbanaco, adquirida por el Grupo QuirónSalud el pasado año. Imbanaco es una clínica privada con más de 40 años de trayectoria, que cuenta con un amplio espectro de servicios médicos, además de múltiples acreditaciones y certificaciones a nivel nacional e internacional. Desde 1999, la Unidad de Medicina Reproductiva ha hecho posible que la población de la región acceda a técnicas de alta y baja complejidad, con un laboratorio que reúne óptimas condiciones de infraestructura y altos estándares de calidad. La fusión o más bien absorción de la clínica por parte del Grupo QuirónSalud es motivadora y esperanzadora en el sentido de crecimiento y mejora constante. La posibilidad de crecer y estar a la vanguardia en Reproducción se hace más palpable ahora a la sombra de un grupo grande e importante en Europa.

ASEBIR: Los cambios, como hablábamos, siempre pueden llevar grandes cosas. Y a colación de lo que comentábamos de los ciclos, ¿cuántos ciclos aproximadamente realizáis en vuestro centro?

Diana: Nuestro promedio de ciclos de Fecundación in vitro por año es de 180, además de unos 100 ciclos de transferencia de embrión congelado en promedio, inseminaciones intrauterinas, seminogramas, etc. Es común la práctica de la FIV convencional, dado que tenemos muchos pacientes con un factor masculino normal y que reúnen las demás condiciones para realizarla.

ASEBIR: Y en cuanto al número de embriones a transferir, o el día de cultivo para la transferencia, ¿qué puedes contarnos en vuestro caso?

Diana: Todavía no conseguimos pasarnos del todo a la transferencia de embrión único, lo que en inglés conocemos como SET, pues, pese a la buena llegada de embriones a blastocisto (40 – 60 %), es una labor titánica convencer a los pacientes de no transferir dos. Aquí se tiene ese pensamiento de mejor dos que uno, y que la abuela, la tía, la prima y media familia colaboran en el cuidado de los niños.

ASEBIR: Un sentimiento difícil de cambiar con esos argumentos, claro... Y en cuanto a medios, aparataje, etc., ¿qué puedes contarnos en general para con los centros?

Diana: En este sentido, la diferencia se nota en cosas como la adquisición de los equipos, medios e insumos. Hay escasos proveedores, y aunque si podemos tener acceso a las marcas universalmente utilizadas, a veces es engorroso el proceso de compra, el papeleo de importación y los costos muy elevados debido a la fluctuación del dólar. El avance tecnológico, sin duda alguna, ha ido lento. Los laboratorios han funcionado bien con lo básico y, pocos centros (no más de dos) cuentan con tecnología tipo Time-Lapse, por ejemplo. También sigue siendo limitada la posibilidad de realizar Biopsia embrionaria.

ASEBIR: Por lo que nos cuentas, es como trabajar aquí al principio de tu formación...

Diana: Sí, más o menos, pero en general los centros cuentan con un aparataje y equipamiento de los laboratorios acorde a tecnología de vanguardia...

ASEBIR: Y, ¿qué puedes contarnos a nivel legal? ¿Muchas diferencias?

Diana: Desde el punto de vista legal, aquí hay un vacío importante para la Reproducción Asistida. Podría decirse que no tenemos una ley clara y contundente, pues terminamos con muchas cosas ambiguas que, ni se permiten, ni se prohíben.

A través de la firma de los consentimientos informados, es posible realizar procedimientos que en España no están permitidos, como la selección de sexo por deseo de los pacientes mediante PGT-A, la donación de gametos de donante conocido (pariente, amigo, etc.), y en algunas clínicas se practica también la subrogación de útero.

ASEBIR: Temas puestos sobre la mesa para debate en muchas ocasiones y en muchos países...

Diana: Así es, y en cuanto a esto de la gestación subrogada, cada centro toma la decisión de hacerlo o no. Y los que lo han hecho, han tenido que asesorarse y estar acompañados durante todo el proceso con abogados, consentimientos y el papeleo complejo para sortear el tema jurídico que pueda presentarse al momento del nacimiento del niño. Realmente es un riesgo, por lo que, en la clínica donde yo trabajo, no lo hemos hecho y creo que así estaremos hasta que la ley sea más clara al respecto.

ASEBIR: Y más con un tema que puede acarrear muchos problemas éticos y legales, tanto para la clínica, como para los pacientes o las gestantes; hay que ir con mucho cuidado si no hay legislación al respecto. Y, ¿puedes hablarnos un poco más de la donación que sabes que ha estado sometida a debate en muchas ocasiones aquí en España?

Diana: La donación de ovocitos tiene ciertas limitaciones aquí. Sabemos que la donación debe funcionar como un proceso voluntario y altruista, pero también sabemos que ser donante de ovocitos implica visitar repetidamente la clínica, someterse a múltiples exámenes, ecografías, la punción bajo sedación etc., con lo cual, como pasa en España, y siendo honestos, muy raramente una donante acude a donar por amor al arte, pues la inmensa mayoría lo hacen por la compensación económica que se les da por el proceso.

Pero aquí, el ente regulador de bancos de gametos y de se-

men nos ha puesto las cosas un poco más difíciles, no se puede, ni tan siquiera, hablar de esa compensación, ni se puede convocar a la donación por medios publicitarios, lo que nos hace tener programas de ovodonación limitados por la escasez de donantes. Esto ha promovido lastimosamente las donaciones conocidas en aquellas pacientes que tienen prisa por realizar el tratamiento y que cuentan con su propia donante.

ASEBIR: Con todas las consecuencias que esto puede tener a muchos niveles...

Diana: Sí, exacto. Es un tema demasiado polémico y extenso, difícil de manejar. Muchos grupos defienden el derecho a que los hijos nacidos de donación de gametos conozcan la verdad, y sepan quién es su progenitor, pero las opiniones están muy divididas.

Yo definitivamente prefiero la donación anónima, ojalá las cosas cambien y en un futuro no muy lejano podamos tener programas de ovodonación con una estructura diferente, más abiertos a promover y convocar a la población a donar sin tanta traba.

ASEBIR: Y cuando estos donantes, anónimos o no anónimos, no están disponibles, ¿disponéis de alternativas?

Diana: Se nos ha vuelto ya casi rutinario adquirir semen de bancos extranjeros, sobre todo de Estados Unidos, la escasez de donantes de los últimos años ha promovido esta práctica. El proceso es relativamente sencillo, pero eso sí, se encarecen los costes de manera importante.

ASEBIR: Y, ¿podríamos decir que tenéis turismo reproductivo, a causa, por ejemplo, de esas "ventajas" legales que comentábamos antes?

Diana: A diferencia de España, no tenemos afianzado el turismo reproductivo. Nosotros si tenemos algunos pacientes, pero en su mayoría colombianos que viven en Estados Unidos, y que vienen aquí motivados básicamente por la reducción de costes respecto allí (entre un 40 - 50 %), pero no son un gran número.

ASEBIR: Bueno, Diana, y tal vez llegamos a una pregunta que cualquier socio/lector que te esté leyendo se haya podido preguntar con bastante probabilidad mientras iba leyendo... ¿allí el trabajo está bien remunerado?

Diana: Pues esa es una de las diferencias con España, la remuneración. Creo que lastimosamente en mi país los embriólogos aún no estamos considerados como se debería, y como comentaba Andrés desde México, los salarios son bajos, trabajamos más horas y tenemos menos días de vacaciones.

ASEBIR: Vaya... ¡Y mandamos un saludo a Andrés de parte de todos! El sentimiento de mala remuneración para los embriólogos también lo compartimos aquí en muchas ocasiones. Aunque somos la mitad del proceso...

Diana: Así es Laura, soy de las que siempre he creído que en esta carrera somos importantes todos, los médicos y los biólogos, unos sin otros no hacemos nada, pero, definitivamente el laboratorio de FIV se lleva la medalla.

ASEBIR: En fin, aún nos quedan muchas cosas por luchar, pero ese es otro tema que merecería un apartado adicional. Y nos acercamos al final de la entrevista, Diana. ¿Qué te gustaría añadir?

Diana: Saliéndome del tema profesional y científico, me gustaría hablar un poquito de esa parte más personal y emocional de mi experiencia de vida (trataré de no ponerme en exceso romántica claro...). ¡Jajaja!

(Todos ríen)

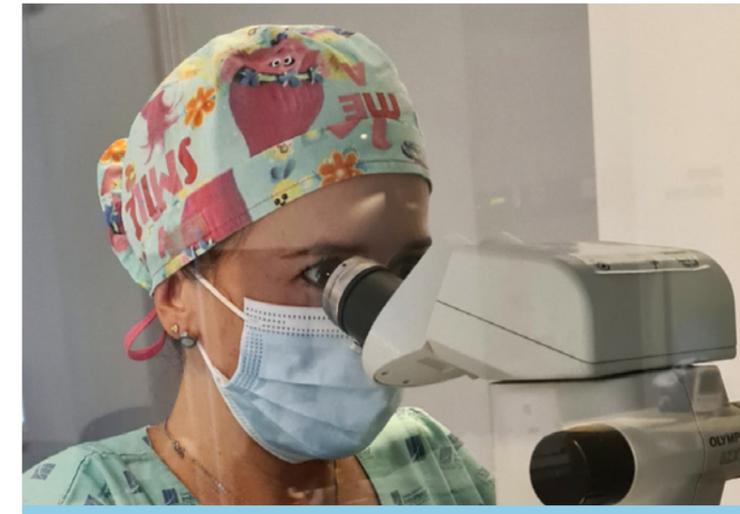
A día de hoy, sigo echando de menos muchas cosas de España. Sin titubear diría que Murcia es una ciudad extremadamente agradable por muchas cosas, el clima, la comida, la gente, y definitivamente, siempre será mi segundo hogar. También extraño algunas comodidades que son escasas en países en desarrollo como el mío: las autovías, el tren, ni hablar del AVE, el carril bici, los escenarios deportivos... y la seguridad, esto sobre todo.

Lo más lamentable aquí, es el tema de la inseguridad, eso es un lastre para casi toda Latinoamérica, pero Colombia se ha visto siempre reseñada por los problemas de orden público. La delincuencia ha ido en aumento, como consecuencia de tener uno de los niveles más altos de desigualdad del mundo. La inequidad social es muy marcada, el nivel de desempleo va en aumento, no solo a causa de la pandemia, sino también de la población desplazada de sus pueblos y de sus tierras a causa de la violencia.

El hecho es que a todo te acostumbras, aprendes por dónde ir y por dónde no, a no dar mayor oportunidad a los delincuentes y aprendes a disfrutar todo lo demás; que son muchas cosas!

ASEBIR: ¡Podemos dar fe de ello!

Diana: Pese a los muchos problemas de este país, estoy firmemente convencida de que Colombia es un paraíso, un lugar extremadamente rico, privilegiado en recursos naturales y lugares hermosos que visitar, con el mejor de los climas, culturalmente amplio y abundante en talento humano de calidad.



Contrario a esa fama nefasta que nos ha acompañado durante años con el narcotráfico, aquí hay gente buena, trabajadora, emprendedora que lucha día a día por mejorar al país. Lastimosamente afuera, se conoce mucho de lo malo y se omite lo bueno. Pero si estás aquí, realmente lo ves todo, lo bonito y lo feo, y lo primero es lo que predomina. Particularmente, me he movido por muchos sitios de la región incluso del país, y no me ha sucedido nada, es cuestión de tomar precauciones.

Pero si, se podría decir que siempre tendré un poco el "corazón partido" y mis sentimientos repartidos entre la madre patria y mi hermosa Colombia. Los invito a conocer esta tierra, quien se anime, bienvenido será: mi casa estará de puertas abiertas para aquel que se lance a la aventura.

ASEBIR: ¡Te cogemos la palabra, Diana! A nosotros nos has convencido, ¡hay que ir a Colombia y descubrirla! Y te damos las gracias por tu participación, y compañía. Hemos compartido un rato muy agradable y seguro que a nuestros lectores ¡les ha encantado!

Diana: Muchas gracias a vosotros por dejarme mostraros un poquito de mí y de mi historia. Animaos a participar, ¡es una experiencia muy bonita y gratificante!

ASEBIR: ¡Exacto! Hasta pronto, Diana.

Si deseáis participar en esta sección solo debéis escribirnos un mensaje a la Secretaría de ASEBIR en el correo asebir@asebir.com, diciéndonos el país en el que trabajáis y nos pondremos en contacto con vosotros a la mayor brevedad posible. ¡Animaos a participar!

GAS IN-LINE



Elimina COV's y partículas antes de entrar en el incubador.



OCTAX NAVILASE



Para un perfecto control de la biopsia embrionaria con una mayor facilidad y eficacia.

Un nuevo láser con tecnología específica para PGS y DGP.



CABINA FLUJO LAMINAR VERTICAL TERMOSTATIZADA



Con fuentes de iluminación OCC (tipo Hoffman).



DEFEND 1050



El Defend 1050 y su tecnología NanoStrike® patentada por NOVAERUS es la solución más eficaz, rápida y segura para la desinfección y purificación continua del aire en Laboratorios de FIV.



EMBRYOGLUE



Medio de transferencia más documentado que incrementa la tasa de nacido vivo.



AGUJAS ASPIRACIÓN FOLICULAR VITROLIFE



Diseñadas para la recuperación ovocitaria. Optimizando el tiempo, el control en la aspiración y mejorando el confort de la paciente.



LABWARE VITROLIFE



Para mejorar las condiciones de cultivo de los embriones. Con marcaje CE para IVF.



MICROPIPETAS VITROLIFE



Micropipetas de alta precisión. Toda gama de tipos y angulaciones.





GRAMOLA LAB

AÏDA Casanovas Fontanillas

En esta ocasión, para esta sección, tenemos una socia muy polifacética: embrióloga freelance, músico y *chocolatier*.

Cómo llega una embrióloga a crear su propio obrador, llegando a gran parte de los embriólogos de España por el paladar, lo descubrimos en esta sección. ¡Vamos a conocerla!

► ENTREVISTA

ASEBIR: ¡Muy buenas, Aïda! ¡Qué placer más maravilloso tenerte aquí con nosotros!

Aïda Casanovas: Gracias Laura, no sabes lo agradecida que estoy que ASEBIR me haya dado la oportunidad de formar parte de este número en la sección de socios emprendedores. ¡Espero que os guste!

ASEBIR: ¡No te quepa la menor duda! Pero como siempre, y para que los lectores sepan quién eres, cuéntenos un poco de ti.

Aïda: ¡Claro! Me presento. Mi nombre es Aïda Casanovas Fontanillas, socia número 956 y soy residente en Barcelona. Y para que entendáis como se llega al final de mi historia, es necesario que sepáis que me apasiona la embriología, el chocolate, la buena comida y la música.

ASEBIR: ¡Vaya! Creo que muchos lectores coincidirán en todas de esas pasiones ¡Jajaja!

(Todos ríen).

Aïda: Y, ¡soy batería desde los 14 años! Y poder combinarlas todas en mi vida, ¡solo me aporta cosas positivas!

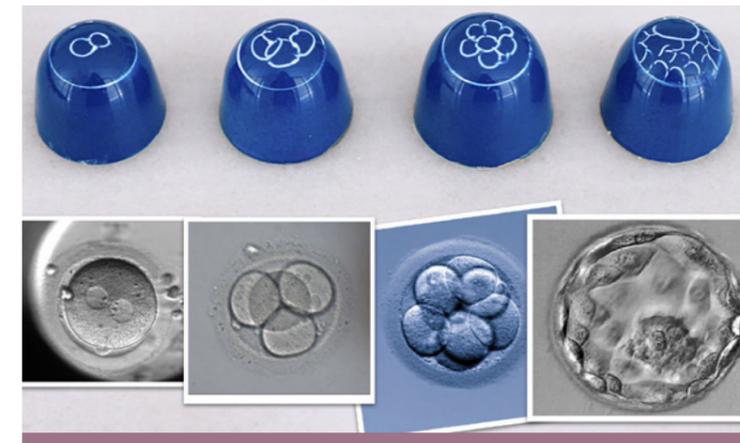
ASEBIR: Como sabemos, si convertimos las aficiones en trabajos, no tendremos que trabajar nunca... Cuéntenos un poco tu trayectoria.

Aïda: ¡Qué gran verdad! En mi caso, tras licenciarme en Biología por la Universidad Autónoma de Barcelona, me inicié en el mundo de la fecundación in vitro en la facultad de Veterinaria de la misma universidad en el año 2003.

Entre medios "home made", ovarios de cabra prepúber y semen que obteníamos de los caprinos de la granja de Veterinaria, encontramos la manera de sexar los embriones caprinos mediante FISH. De allí que mis primeros años en el sector fueron en el Centro de Medicina Embrionaria en Barcelona (Instituto Marqués).

ASEBIR: ¿Y el salto a la reproducción humana?

Aïda: Pues la formación como embrióloga dentro el laboratorio de FIV, la tuve trabajando en "The Bridge Centre" en Londres y en "Newlife", Epsom.



En 2013 regresé a Barcelona como responsable de laboratorio en la Unidad de Endocrinología Ginecológica donde trabajé durante 4 años hasta que me uní en el proyecto de la nueva clínica Fertty en el centro de Barcelona. Esta última etapa como directora de laboratorio en Fertty fue una gran experiencia pero mi absoluta dedicación al centro no me permitía nunca a hacer el paso para poder hacer mi sueño realidad.

ASEBIR: Mucha dedicación nuestra bonita profesión...

Aïda: Qué bien lo sabemos, ¿eh?... Así que después de 15 años en el mundo de la reproducción asistida, decidí dar un giro a mi vida y dedicarme al mundo del chocolate.

ASEBIR: Umh... chocolate. ¡Gran placer! Cuéntenos, nos tienes enganchados, como el placer de un buen dulce...

Aïda: ¡Jajaja! Me cautivó des del primer instante, y me doy cuenta que requiere la misma precisión, exigencia y rigurosidad que he necesitado siempre en el laboratorio de fecundación in vitro. ¡Es maravilloso!

Y así nace Gramola Lab, fruto de una reinención, de la pasión por el chocolate y la necesidad de crear belleza en un laboratorio de ilusiones dando como resultado productos especiales, diferentes, divertidos, únicos y deliciosos...

ASEBIR: Y muchos embriólogos pudimos dar fe de ello... ¡Deliciosamente adictivos! Pero ahora llegaremos a esa parte... ¿dejaste entonces la embriología?

Aïda: ¡No! ¡Para nada! No obstante, al convertirme en autónoma, continuo desarrollando mi profesión en el sector como embrióloga freelance para todos aquellos centros que requieren mis servicios por algún pico de trabajo muy puntual o bien para realizar biopsias embrionarias para laboratorios de análisis. Además, colaboro con Cooper Surgical y viajo a centros de España realizando workshops de biopsia embrionaria.



SOCIOS EMPRENDEDORES ASEBIR

AÏDA CASANOVAS FONTANILLAS. GRAMOLA LAB.



ASEBIR: Y, el obrador, ¿dónde está y qué puedes contarnos de cómo surgió?

Aïda: El obrador Gramola Lab está situado en Badalona. No tenía intención de que pareciera un laboratorio pero los compañeros que habéis venido... ¡eso me decís!

Cierto es, que el obrador cuenta con un vestuario, un almacén, un despacho, la zona de trabajo y la zona de pintado. Somos 4 en el equipo de momento y tengo la suerte de contar con la ayuda y experiencia de mi madre que es uno de los pilares principales en este proyecto. Nos organizamos la semana según los pedidos y las necesidades del obrador.

ASEBIR: Y ¿cómo os organizáis? Me temo que aquí también se va a parecer a nuestra querida profesión,...

Aïda: Tenemos unos días marcados para el pintado de bombones ya que es muy importante dejar reposar 24h la manteca de cacao con la que has pintado el molde para poder continuar con el proceso.... Hasta que no llegas a desmoldarlos pasas por una serie de etapas que requieren su tiempo. Tenemos que contar el proceso en un total de 3 días. ¡Ya te puedes imaginar qué emoción cuando salen perfectos!

ASEBIR: ¡Sí! Como cuando esperamos viendo las divisiones de los primeros días de los embriones...

Aïda: ¡Totalmente! Igual que cuando observas los embriones hasta día 5 de una paciente,... ¡Madre mía! ¡Siempre ha sido emocionante este momento! (y algunos los he disfrutado más que otros claro, como todos imagino).

Aunque en el caso de los bombones, cuando, de vez en cuando, alguno sale mal, ¡aprovechamos para comérmolos! ¡Jejeje!

(Todos ríen)

Luego también nos organizamos para la preparación del fin de semana que es cuando más trabajo se acumula.

ASEBIR: Ajá...

Aïda: Sí, ¡jajaja! Los fines de semana, ¡ay!

En general nos dedicamos básicamente al chocolate, a la producción de bombones de diseño, turrónes especiales y tabletas de chocolate; pero también preparamos muchos pasteles con decoraciones diferentes y con mucho estilo y otras delicias.

Los bombones los pintamos a mano en el "laboratorio" de pintado, con pinceles o aerógrafo. Utilizamos manteca de cacao y colorantes naturales (a ser posible) y el truco para que brillen está en trabajar muy bien el chocolate y la manteca de cacao, respetando las curvas de temperatura que necesita y pintando a la temperatura adecuada.

¡Y de aquí a dejar volar la imaginación! Siempre trabajando con precisión y constancia.



SOCIOS EMPRENDEDORES ASEBIR

AÏDA CASANOVAS FONTANILLAS. GRAMOLA LAB.

Y cómo no... como pasa con nuestra querida embriología, también aquí contamos con protocolos (recetas), tablas de control de producción y muchos proveedores... así que ya veis que hay muchas similitudes.

ASEBIR: Sí, sí... la verdad es que sí.

(Todos ríen).

ASEBIR: ¿Y cómo nació la idea de mandar embrio-bombones a los embriólogos? A todos los que tuvimos la oportunidad de probarlas, nos dejaron impresionados...

Aïda: ¡Ay sí! ¡Qué alegría ese trabajo! Pues todo surgió porque Cooper Surgical quería agradecerle a sus clientes el apoyo durante un año difícil (como había sido el 2020) y ya que nos hemos especializado en bombones pues pensamos en esta posibilidad: mandar bombones con el desarrollo embrionario.

Fueron alrededor de 2600 bombones, de los cuales 1000 se dibujaron uno por uno a mano.

ASEBIR: ¿A mano? ¡Uauu!

Aïda: ¡Os prometo que es super relajante! ¡Ya os podéis imaginar que eso parecía un ejército de bombones azules!

Lo que sí que no me esperaba fueron todas las fotos que los compañeros subieron en LinkedIn... ¡qué pasada y qué alegría! Estoy tremendamente agradecida de que Cooper Surgical confiara en Gramola Lab y que os hayan gustado tanto los bombones.

ASEBIR: ¡Buenísimos! Y la avalancha azul que vimos en LinkedIn fue muy chula... ¡Enhorabuena por vuestro trabajo!

Aïda: ¡Fue increíble! Estoy feliz de haber encontrado un equilibrio entre la embriología y el chocolate, y poder trabajar de ambas me hace sentir muy afortunada.

ASEBIR: Nos alegramos mucho por ti, Aïda, y muchas gracias por dedicarnos este ratito que tanto hemos disfrutado y aprendido, y por mostrarnos esa dulzura que tanto se parece a nuestro trabajo... ¡Gracias por todo!

Aïda: Muchas gracias a vosotros, y animo a todo aquel que pueda a participar en las secciones de la revista, que lo haga, ¡es verdaderamente divertido! Gracias de corazón.

ASEBIR: Gracias a ti, y si como Aïda quieres pasar un rato agradable y tienes algo interesante que contarnos, no dudes en ponerte en contacto con nosotros a través del correo asebir@asebir.com para hacernos llegar tu petición, que responderemos en la mayor brevedad posible. ¡Animaos a participar!



CRONOLOGÍA DE LA EDICIÓN GENÉTICA EN EMBRIONES HUMANOS: DESDE LA TECNOLOGÍA CRISPR/CAS9 HACIA NUEVAS ESTRATEGIAS MEJORADAS

CHRONOLOGY OF GENE EDITING IN HUMAN EMBRYOS: FROM CRISPR/CAS9 TECHNOLOGY TO NEW IMPROVED STRATEGIES

Ana Carbajo Uña. Centro de formación "IVI Learning Center". Calle Guillem de Castro, 9, 46007 Valencia. Estudiante del Máster Universitario en Biotecnología de la Reproducción Humana Asistida de la Universitat de València.

E-mail: anacarbajo@usal.es

► RESUMEN

Con el rápido avance de las técnicas de ingeniería genética en los últimos años, ha surgido la posibilidad de manipular genéticamente la línea germinal humana. Entre los diferentes sistemas de edición disponibles, la tecnología CRISPR/Cas9, Premio Nobel de Química 2020, se ha establecido como la herramienta de preferencia por sus múltiples ventajas: mayor eficacia de corte, versatilidad y asequibilidad. Así, el primer trabajo de edición genética en embriones humanos con fines terapéuticos se presentó a principios del año 2015 empleando este sistema. A partir de entonces, han ido gestándose numerosas investigaciones en distintos laboratorios situados en EE.UU. y China, principalmente. Recientemente, en diciembre de 2020, Zuccaro y colaboradores demostraron que la utilización del sistema CRISPR/Cas9 para la corrección de mutaciones puntuales en embriones humanos puede generar pérdidas cromosómicas parciales o completas; derivando así en posibles aneuploidías y anomalías en el desarrollo. Ante esta problemática, las nuevas tecnologías de *Base* y *Prime editing* han surgido como nuevas estrategias alternativas, basadas en mejoras del sistema CRISPR convencional y con un futuro muy prometedor en el tratamiento de enfermedades monogénicas. Sin embargo, la edición genética de embriones sigue estando aún muy alejada de un posible traslado a la práctica clínica y resultan necesarios muchos más estudios que profundicen en la seguridad de estas tecnologías.

PALABRAS CLAVE: edición genética, CRISPR/Cas9, terapia génica germinal, embriones humanos, corrección, enfermedad monogénica, eliminación cromosómica, Cas9 nickase, *Base editing*, *Prime editing*.

► ABSTRACT

The possibility of genetic manipulation on the human germline has emerged in recent years, thanks to the huge advancement in genetic engineering techniques. Among the available edition systems nowadays, the CRISPR/Cas9 technology, Nobel Prize in Chemistry 2020, has been established as the tool of choice due to its many advantages: greater cutting efficacy, versatility and affordability. Thus, the first work on gene editing in human embryos for therapeutic purposes was presented at the beginning of 2015 using this system. Since then, many investigations have been carried out in different laboratories mainly located in the USA and China. Recently, in December 2020, Zuccaro et al. demonstrated that the use of the CRISPR / Cas9 system for correcting point mutations in human embryos can generate partial or complete chromosomal losses; thus originating possible aneuploidies and abnormalities in development. Faced with this problem, the new *Base* and *Prime editing* technologies have raised as new alternative strategies, based on an improved CRISPR system and with a very promising future in the treatment of monogenic diseases. However, genetic editing of embryos is still very far from a possible transfer to clinical practice and many more studies are necessary to deepen the safety of these technologies.

KEY WORDS: gene editing, CRISPR/Cas9, germline gene therapy, human embryos, correction, monogenic disease, chromosome removal, Cas9 nickase, *Base editing*, *Prime editing*.

Cronología de la edición genética en embriones humanos: Desde la tecnología CRISPR/CAS9 hacia nuevas estrategias mejoradas

1. INTRODUCCIÓN

Las técnicas de ingeniería genética han experimentado un rápido avance durante los últimos treinta años y la posibilidad de manipular genéticamente la línea germinal humana se ha convertido en un evento viable técnicamente hablando.

Desde que tuvo lugar el primer experimento de edición genética, en 1985, han ido apareciendo diferentes herramientas para lograr la modificación específica del genoma. Todas ellas se basan en el empleo de nucleasas específicas de secuencia (SSNs, *sequence-specific nucleases*), es decir, enzimas que cortan el ADN mediante el reconocimiento de secuencias concretas. Hasta el momento actual, se han desarrollado los siguientes cuatro tipos, ordenados por orden cronológico de aparición (Wen et al., 2020): meganucleasas, nucleasas de dedos de zinc (ZFNs, *Zinc-Finger Nucleases*), nucleasas de actividad similar a activadores de transcripción (TALENs, *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) y nucleasas Cas (*CRISPR associated*). Estas últimas se han convertido en la herramienta de edición genética de preferencia adoptada por la mayor parte de los laboratorios, gracias a tres ventajas principales frente a las anteriores: mayor eficacia de corte, versatilidad y asequibilidad. Así, el conocido como sistema CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9*), en lo sucesivo abreviado como sistema CRISPR, ha tomado una posición central en multitud de trabajos de investigación desde su presentación en el año 2012 (Jinek et al., 2012). Tal ha sido su trascendencia que, el pasado 7 de octubre de 2020, las investigadoras Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier recibieron el Premio Nobel de Química por sus investigaciones sobre esta tecnología como método para la edición del genoma.

2. TECNOLOGÍA CRISPR/CAS9 PARA LA TERAPIA GÉNICA GERMINAL

Antes de profundizar en cómo se puede aplicar el sistema CRISPR a la línea germinal, resulta interesante repasar sus fundamentos.

Cualquier sistema CRISPR de edición consta de tres componentes básicos: la nucleasa Cas9, una guía de ARN (ARNg) complementaria a la región genómica diana y un fragmento de ADN que servirá de molde para la edición específica de dicha secuencia diana (Fig. 1). Estos componentes pueden ser introducidos en la célula diana empleando distintos métodos de transfección, como la electroporación o la microinyección.

Brevemente, el sistema CRISPR funciona de la siguiente manera (Greenfield, 2018): en el interior de la célula diana, el

ARNg se une, por complementariedad de bases, a la secuencia del ADN para la que ha sido específicamente diseñado. Esta unión provoca el reclutamiento de la Cas9. La nucleasa reconoce, sobre el ADN diana, una secuencia contigua a la complementaria del ARNg, denominada PAM (*Protospacer Adjacent Motif*). A continuación, provoca la separación de las dos hebras del ADN de forma localizada y utiliza su actividad nucleasa para inducir un corte de doble cadena (DSB, *Double-Strand Break*), a tres nucleótidos de distancia de la PAM y en dirección a la zona de complementariedad ADN-ARNg (Fig. 1). Tras el corte, se activan los sistemas endógenos habituales de reparación de daño en el ADN. Así, la reparación del corte puede ocurrir mediante dos vías: unión de extremos no homólogos (NHEJ, *Non-Homologous End Joining*) o reparación dirigida por homología (HDR, *Homology-Directed Repair*). La ruta NHEJ resuelve el corte introduciendo inserciones y deleciones (INDELS) de forma aleatoria; dando lugar a un fenómeno de inactivación génica (Fig. 1(i)). Por su parte, la vía HDR (únicamente activa en células en división) utiliza un fragmento de ADN molde con la secuencia de interés para resolver el corte mediante recombinación homóloga (HR, *Homologous Recombination*); dando paso a un evento de edición génica (Fig. 1(ii)). En la mayoría de tipos celulares coexisten ambas rutas, aunque la vía NHEJ es la predominante en todas ellas.

A día de hoy, la edición de la línea germinal humana es posible aplicando el sistema CRISPR a tres niveles (Fig. 2): células madre pluripotentes inducidas (iPSC), células germinales o embriones preimplantacionales (Vassena et al., 2016). Sin duda, la utilización de embriones como dianas de edición representa la estrategia más ambiciosa y atractiva. En consecuencia, a continuación se hará un repaso cronológico de los inicios de la edición genética en embriones humanos empleando el sistema CRISPR, desde el primer experimento en el año 2015 hasta la actualidad (Fig. 3).

3. CRONOLOGÍA DE EDICIÓN GENÉTICA MEDIANTE CRISPR/CAS 9 EN EMBRIONES HUMANOS

Cabe destacar que la mayoría de investigaciones se han centrado en la corrección de mutaciones puntuales responsables del desarrollo y aparición de enfermedades monogénicas, es decir, son estudios planteados con fines de investigación terapéutica.

De forma minoritaria, pero no menos importante, los estudios con fines de investigación básica han tratado de profundizar en el conocimiento actual relativo a la biología del desarrollo en humanos. El único trabajo publicado hasta la fecha dentro

AULA JOVEN

*Cronología de la edición genética en embriones humanos:
Desde la tecnología CRISPR/CAS9 hacia nuevas estrategias mejoradas*

de este último enfoque se presentó a finales del año 2017 y demostró que la proteína OCT4 desempeña un papel crucial en el desarrollo temprano del embrión humano, a diferencia de lo predicho en modelos murinos (Fogarty et al., 2017). Sin embargo, el primer estudio en explorar la capacidad de corrección de una mutación puntual dentro de un enfoque terapéutico apareció un par de años antes.

AÑO 2015

El 18 de abril de 2015 quedó marcado como fecha clave en la historia de la edición genética en embriones humanos. Liang y colaboradores presentaron un trabajo para evaluar la eficacia del sistema CRISPR en la especie humana y compararla con la encontrada en modelos murinos (Liang et al., 2015). Su diana fue el gen de la betaglobina humana (HBB). Éste se encuentra mutado en graves enfermedades monogénicas de la sangre, tales como la betatalasemia o la anemia falciforme. Microinyectaron cigotos tripronucleares (3PN) aberrantes con el sistema CRISPR y el ADN molde (portando diferentes mutaciones silenciosas). Transcurridas 48 horas, el 83% de los embriones sobrevivieron a la agresión que supone la microinyección. Sin embargo, la vía HDR de edición génica deseada solo actuó en el 5,6% de ellos. Es decir, el porcentaje de embriones totales correctamente editados fue inferior al 5%, eficiencia similar a la encontrada frecuentemente en modelos murinos. Además, todos los embriones editados fueron mosaicos. Se reportó también un número considerablemente alto de off-targets.

AÑO 2016

Aproximadamente un año después, en mayo de 2016, Kang y colaboradores presentaron un segundo trabajo en el que trataron de introducir diferentes mutaciones en el gen CCR5 como estrategia terapéutica para combatir la infectividad del VIH (Kang et al., 2016). El receptor CCR5 se encuentra en la membrana de los linfocitos y es utilizado por el VIH para penetrar al interior celular. Al igual que en el caso anterior, se microinyectaron cigotos 3PN donados con el sistema CRISPR y se encontró la mutación de interés en el 5-15%. Estos porcentajes supusieron una leve pero significativa mejora en la eficiencia, en comparación con el estudio previo. Además, no se detectó la presencia de off-targets. Sin embargo, las tasas de mosaicismo fueron igualmente elevadas, manteniéndose superiores al 50%.

AÑO 2017

Posteriormente, en junio de 2017, Tang y colaboradores llevaron a cabo el primer estudio con cigotos humanos diplo-

nucleares (2PN) (Tang et al., 2017). La utilización de cigotos con una carga genética normal tenía la ventaja de eliminar la variabilidad aportada por las anomalías intrínsecas de los cigotos 3PN. Su trabajo se centró en la edición específica dos genes: HBB, que había sido previamente testado por el equipo de Liang en 2015, y G6PD. Este último codifica la enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), cuya mutación puntual más común (G1376T) afecta a un alto porcentaje de la etnia Han (92% de población china y en el 20% de la población mundial) y puede provocar anemia hemolítica en caso de exposición a estrés oxidativo. Tang y colaboradores utilizaron tanto cigotos 3PN como 2PN para evaluar si existían diferencias entre ellos en cuanto a eficiencias de edición. Los cigotos 2PN se obtuvieron a partir de ovocitos inmaduros sobrante de ciclos de reproducción asistida, posteriormente madurados in vitro y fertilizados con esperma donado mediante ICSI. En el caso de los cigotos 3PN, estos fueron donados de forma habitual. Como resultado del estudio, demostraron que el sistema CRISPR mantenía su actividad en cigotos humanos 2PN y que, además, la eficiencia de la vía HDR resultaba mucho mayor en estos cigotos 2PN (~ 25%) en comparación con los 3PN (20% y 10%, para G6PD y HBB respectivamente; porcentajes similares a las eficiencias de los estudios previos de los equipos de Liang y Kang). No obstante, las tasas de mosaicismo genético encontradas, de nuevo, fueron extremadamente altas.

Poco tiempo después, en agosto de 2017, se publicó un artículo de alto impacto por parte de un prestigioso equipo dirigido por Mitalipov en Oregón, EE.UU. (Ma et al., 2017). Se trataba del primer trabajo destacable fuera de las fronteras chinas. Su objetivo residía en conseguir corregir una mutación en el gen MYBPC3 que está asociada a la aparición de cardiomiopatía hipertrófica. Esta grave enfermedad cardiovascular muestra un patrón de herencia autosómico dominante y puede aparecer en la edad adulta de forma súbita. El laboratorio de Mitalipov optó por crear, ad hoc, cigotos 2PN a partir de ovocitos donados por mujeres sanas (homocigotas "aa") y esperma de varones portadores (heterocigotos "Aa"). Así, de acuerdo a las proporciones mendelianas, se esperaba un 50% de embriones sanos ("aa") para el grupo control. Tras la microinyección del sistema CRISPR junto al esperma fecundante en el grupo experimental, se encontró que el 72,4% de los embriones eran sanos ("aa") y el 27,6% restante presentaban INDELS diferentes a las esperadas. De esta forma, el 22,4% adicional (con respecto a las proporciones mendelianas) de embriones "aa" encontrados se atribuyó a una acción exitosa del sistema CRISPR. Sin embargo, sorprendieron dos hechos (Baumann, 2017): no se describió la presencia aparente de embriones mosaico ni la de embriones con el alelo mutante ("Aa"), dando a entender que todos habían sido corregidos. Además, cabe destacar que en una parte considerable de este subgrupo microinyectado se introdujeron todos los componentes del

AULA JOVEN

*Cronología de la edición genética en embriones humanos:
Desde la tecnología CRISPR/CAS9 hacia nuevas estrategias mejoradas*

sistema CRISPR excepto el ADN molde y los porcentajes de embriones "aa" permanecieron igualmente superiores al 50%. Esto se tradujo en la siguiente interpretación: el alelo materno sano ("a") habría servido como molde para corregir el alelo paterno mutado ("A") en los embriones generados (Fig. 4).

Estos resultados sorprendentemente exitosos desencadenaron un gran revuelo a nivel internacional. Se hizo un llamamiento a la prudencia hasta confirmar su reproducibilidad. Sin embargo, el principal obstáculo residía en el carácter ilegal de la creación de embriones ad hoc en muchos países (Lluís Montoliu, 2019). A pesar de ello, durante todo el año siguiente se fueron gestando y consolidando dos trabajos independientes (Egli et al., 2018; Adikusuma et al., 2018) que cuestionaron los experimentos del equipo de Mitalipov. Sus respectivos argumentos, junto con la consecuente respuesta de los autores del trabajo original (Ma et al., 2018), se publicaron oficialmente y de forma conjunta en agosto de 2018.

AÑO 2018

En primer lugar, Egli y colaboradores (Egli et al., 2018) recogieron tres críticas frente al trabajo original del equipo de Mitalipov:

Primera: el éxito reportado está asociado a la incapacidad para detectar el alelo mutado y, en consecuencia, ocurre la amplificación exclusiva del alelo sano. Si el corte de la Cas9 se resuelve siguiendo la ruta de reparación NHEJ, se generarían delecciones de extensión variable alrededor del punto de corte que podrían llegar a afectar a las secuencias complementarias de los cebadores utilizados para amplificar la región de interés. Por tanto, si no hay unión de los cebadores, el gen no puede ser amplificado y solo aparecería una banda en el gel de agarosa: la correspondiente al alelo materno no mutado.

Segunda: la pérdida del genoma paterno sucede de forma habitual en ~ 10% de los cigotos generados mediante ICSI y, como consecuencia lógica, solo ocurre la amplificación del alelo materno sano. De esta manera, estos casos se interpretarían como éxitos en la corrección del alelo paterno mutado cuando realmente no sería así.

Tercera: los núcleos paterno y materno se encuentran físicamente separados en el citoplasma del cigoto hasta el embrión en estadio de dos células y, en consecuencia, el alelo materno no puede servir como molde a la hora de corregir el alelo paterno mutado.

En segundo lugar, el trabajo de Adikusuma y colaboradores (Adikusuma et al., 2018) sirvió para confirmar experimentalmente la primera de las críticas presentadas por Egli y colaboradores. Sus trabajos trataron de reproducir parte de la estrategia empleada en el estudio original con embriones

humanos, pero en este caso utilizando como diana seis genes diferentes del genoma del ratón. Sus resultados, avalados por una secuenciación completa de los embriones editados, demostraron que la utilización del sistema CRISPR podía generar delecciones de gran tamaño alrededor del sitio de corte de la Cas9. En consecuencia, la ausencia de bandas correspondientes a los alelos mutados podría ser fruto de la incapacidad de unión de cebadores complementarios a regiones próximas al sitio de corte de la Cas9 (que probablemente habrían sido delecionadas). Así, quedó demostrado que la ausencia de bandas analíticas no puede interpretarse como prueba definitiva de que el sistema CRISPR ha actuado y editado correctamente un determinado gen.

Ante esto, los autores del laboratorio de Mitalipov llevaron a cabo experimentos adicionales y publicaron una respuesta frente a cada una de las críticas previamente expuestas por Egli y colaboradores (Ma et al., 2018):

Primera: la amplificación con cebadores situados a mayores distancias del punto de corte de la Cas9 no evidencia la existencia de delecciones. Ma y colaboradores realizaron nuevas amplificaciones y obtuvieron las bandas correspondientes del tamaño esperado; pero también encontraron un número considerable de bandas de menor tamaño. Estas bandas, que realmente podrían ser producto de delecciones, las asociaron con uniones inespecíficas de los cebadores a otras zonas del genoma. Sin embargo, sus argumentos no se presentaron avalados por la secuenciación de esas bandas inespecíficas ni de los embriones editados.

Segunda: un 10% de embriones partenogénicos no justifican la alta tasa de éxito reportada. La existencia de polimorfismos de nucleótido único (SNP) evidencia la presencia de los genomas paterno y materno en la mayoría de los embriones editados. Sin embargo, los análisis realizados no mostraron resultados totalmente concluyentes.

Tercera: los reactivos CRISPR pueden permanecer activos tras la primera división del cigoto. Demostraron que sus componentes no desaparecerían tras el primer ciclo de división y mantenían su actividad en fases posteriores.

Tanto las críticas de Egli y colaboradores como las respuestas por parte del laboratorio de Mitalipov a cada una de ellas, ambas con sus respectivos argumentos, aparecen resumidas en la Tabla I.

AÑO 2020

Como consecuencia de las grandes delecciones reportadas por Adikusuma y colaboradores en 2018 en embriones de ratón, se evidenció la necesidad de realizar más investigaciones de confirmación en embriones humanos.

AULA JOVEN

Cronología de la edición genética en embriones humanos:
Desde la tecnología CRISPR/CAS9 hacia nuevas estrategias mejoradas

Así, en diciembre de 2020, Zuccaro y colaboradores publicaron un extenso estudio que evaluaba las posibles pérdidas cromosómicas derivadas de intentar corregir una mutación puntual; tanto fuera (*off-target*) como dentro (*on-target*) de la región diana (Zuccaro et al., 2020). Su diana fue el gen EYS, situado en el brazo largo del cromosoma 6 humano (Fig. 5A). La delección espontánea de un nucleótido de guanina en el exón 34 (rs758109813) provoca un cambio en el marco de lectura y desencadena la aparición de retinitis pigmentosa, enfermedad con patrón de herencia autosómica recesiva que produce ceguera. Para evaluar la capacidad de corregir dicha mutación, crearon embriones *ad hoc* utilizando esperma de donantes con la mutación en homocigosis (EYS 2265fs/2265fs) y ovocitos con el alelo silvestre, también en homocigosis (EYS wt/wt). Además, aprovecharon la existencia de polimorfismos de nucleótido único a ambos lados de la mutación a reparar. De esta manera, establecieron tres grupos experimentales (Fig. 5B). En el primero, se derivaron células madre embrionarias y sobre ellas se introdujo el sistema CRISPR (Fig. 5B(a)). En el segundo, se comicroinyectó el sistema CRISPR junto al esperma fecundante sobre los ovocitos MII (Fig. 5B(b)). Y en el tercero, el sistema CRISPR se inyectó en cada una de las blastómeras de embriones en dos células (Fig. 5B(c)). Tanto los embriones del segundo y tercer grupo como las colonias de células madre del primero, se secuenciaron por los métodos de Sanger y *Next Generation Sequencing* y se analizaron mediante *arrays* de polimorfismos de nucleótido único. Los resultados globales que se reportaron se recogen en la Fig. 5C. En la mitad de los embriones se reparó el corte en la región diana y la mayoría de los eventos de reparación siguieron rutas que restauraron el marco de lectura en el *locus*, pero se desconoce la funcionalidad del alelo reparado (Fig. 5C (a, b)). En cambio, solamente un 7% de los eventos siguió la vía HDR para la restauración del alelo silvestre funcional (Fig. 5C(c)). En la otra mitad de embriones, se encontraron pérdidas cromosómicas parciales y/o completas: dentro de la región diana, afectando al propio cromosoma 6 (Fig. 5C (d, e)); y fuera de la misma, en el cromosoma 16 (Fig. 5C(f)). En conclusión, encontraron tasas de edición ínfimas y pérdidas cromosómicas frecuentes asociadas con el sistema CRISPR; conclusiones que se ven apoyadas por la preimpresión de Alanis-Lobato y colaboradores (Alanis-Lobato et al., 2020).

Como consecuencia, ha surgido así una nueva problemática asociada a la corrección de enfermedades monogénicas empleando el sistema CRISPR/Cas9 y, con el fin de superarla, han ido apareciendo una serie de mejoras del sistema CRISPR a lo largo de los últimos años (Anzalone et al., 2020).

4. MEJORAS DEL SISTEMA CRISPR/CAS9

Las nuevas estrategias mejoradas del sistema CRISPR, conocidas como *Base* y *Prime editing*, se basan en el empleo de la Cas9 nicasa (nCas9). La nCas9 se trata de una variante mutada (D10A) de la Cas9 que ha perdido la actividad en uno de sus dos dominios catalíticos. En consecuencia, genera cortes de cadena única, evitando así la problemática previamente expuesta en relación a los de doble cadena (Perisse et al., 2021). Estas tecnologías de *Base* y *Prime editing* presentan potencial para corregir el 25% y 89% de polimorfismos patogénicos de nucleótido único humanos, respectivamente (Kantor et al., 2020). En la Figura 6 se representa una línea temporal con todos los estudios relevantes hasta la actualidad de *Base editing* en embriones murinos (Kim et al., 2017; Liang, Sun et al., 2017; Ryu et al., 2018; Yang et al., 2018; Lee et al., 2018; Lee et al., 2019; Zuo et al., 2019) y humanos (Li et al., 2017; Zhou et al., 2017; Liang, Ding et al., 2017; Zeng et al., 2018; Zhang et al., 2019); así como de *Prime editing* en embriones murinos (Liu et al., 2020; Aida et al., 2020). La ausencia de trabajos de *Prime editing* en embriones humanos se debe a la reciente descripción de esta tecnología (Anzalone et al., 2019); en contraposición a la tecnología de *Base editing*, que fue presentada un par de años antes (Komor et al., 2016). Cabe resaltar que los trabajos de *Base editing* en embriones humanos han reportado tasas de eficiencias de edición que oscilan entre 40-100%, evidenciándose así un futuro muy prometedor para estas nuevas estrategias en el tratamiento de enfermedades monogénicas.

5. DISCUSIÓN

A pesar de disponer de las herramientas técnicas necesarias para llevar a la práctica tratamientos de terapia génica germinal, actualmente sigue siendo un acto prematuro, inseguro, imprudente, irresponsable y, también, ilegal en todos los países que han legislado al respecto. Sin embargo, en octubre de 2018 nacieron Lulu y Nana, las primeras gemelas genéticamente editadas al margen de la legalidad por el ex-investigador He Jiankui, en Shenzhen (China). Existe consenso global en cuanto a la gravedad de dichos acontecimientos y casos similares al de estas gemelas mosaico no pueden volver a repetirse (*National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine and Policy and Global Affairs*, 2019). Además, si se consiguiesen superar sus tres limitaciones principales (tasas de eficiencia bajas, alta presencia de efectos fuera de diana y altas tasas de mosaicismo), la edición genética de embriones humanos para el tratamiento de enfermedades monogénicas quedaría restringida a casos de parejas que técnicamente no pueden generar embriones sanos. En el resto de los casos,

AULA JOVEN

Cronología de la edición genética en embriones humanos:
Desde la tecnología CRISPR/CAS9 hacia nuevas estrategias mejoradas

es conveniente seguir apostando por métodos alternativos como el diagnóstico genético preimplantacional o prenatal (Vassena et al., 2016). Alternativamente a la terapia enfocada a enfermedades monogénicas, también se ha explorado la posibilidad de tratar aneuploidías por cromosomas adicionales. Así, se ha demostrado que la eliminación dirigida de cromosomas, tanto en sistemas *in vitro* murinos y humanos como *in vivo* murinos, es posible mediante el uso del sistema CRISPR/Cas9 (Adikusuma et al., 2017; Zuo et al., 2017). No obstante, resultan necesarios más estudios tanto para la obtención de modelos animales consolidados como para lograr mejoras consistentes en la especificidad y eficiencia de edición, previo testado de la técnica en embriones humanos. Sin embargo, hasta el momento actual no se han publicado nuevos trabajos relevantes en esta línea.

6. CONCLUSIONES

Actualmente, la edición de la línea germinal humana es técnicamente viable aplicando el sistema CRISPR/Cas9 a diferentes niveles, siendo los embriones preimplantacionales las dianas de edición más ambiciosas. Desde el primer experimento que empleó embriones humanos en el año 2015 hasta el momento actual, se han llevado a cabo numerosas investigaciones principalmente centradas en la corrección de mutaciones puntuales asociadas a enfermedades monogénicas conocidas. Estos trabajos han demostrado que la aplicación del sistema CRISPR es posible en embriones humanos y consigue tasas de eficiencia similares a otros modelos de mamífero.

La reciente confirmación en embriones humanos (Zuccaro et al., 2020) de las grandes pérdidas cromosómicas anticipadas en embriones murinos (Adikusuma et al., 2018); así como la baja eficiencia (<< 7%) de edición deseada (Zuccaro et al., 2020), abren una nueva problemática relacionada con la corrección de enfermedades monogénicas por medio del sistema CRISPR/Cas9. Con el fin de superarla, se han ido desarrollando una serie de mejoras del sistema CRISPR en los últimos años. Desde la aparición de las tecnologías de *Base* y *Prime editing* en 2016 y 2019 respectivamente, se han gestado diferentes trabajos para su aplicación en embriones murinos y humanos. Los estudios de *Base editing* en embriones humanos han reportado tasas de eficiencia de edición del 40-100%. Así, estas nuevas estrategias basadas en mejoras del sistema CRISPR se presentan como alternativas con un futuro muy prometedor en el tratamiento de enfermedades monogénicas.

No obstante, la realidad es que la edición genética de embriones está todavía muy alejada de un posible traslado a la práctica clínica y resulta necesario realizar muchos más estudios que profundicen en la seguridad de estas tecnologías.

7. AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Francisco Domínguez, por su generosa disposición y recomendaciones.

8. FIGURAS Y TABLAS

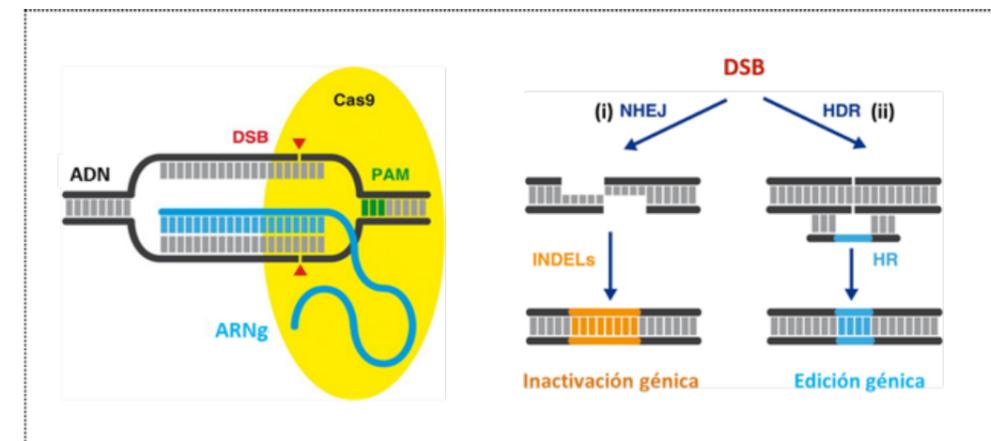


Figura 1. Componentes básicos y funcionamiento del sistema CRISPR/Cas9. Reparación del corte de doble cadena por la ruta NHEJ (i) o HDR (ii). Abreviaturas: ARNg, guía de ácido ribonucleico; PAM, Protospacer Adyacent Motif; DSB, Double-Strand Break; NHEJ, Non-Homologous End Joining; HDR, Homology-Directed Repair; INDELS, inserciones y deleciones; HR, Homologous recombination. Fuente: adaptado de (Lluís Montoliu, 2019).

AULA JOVEN

Cronología de la edición genética en embriones humanos:
Desde la tecnología CRISPR/CAS9 hacia nuevas estrategias mejoradas

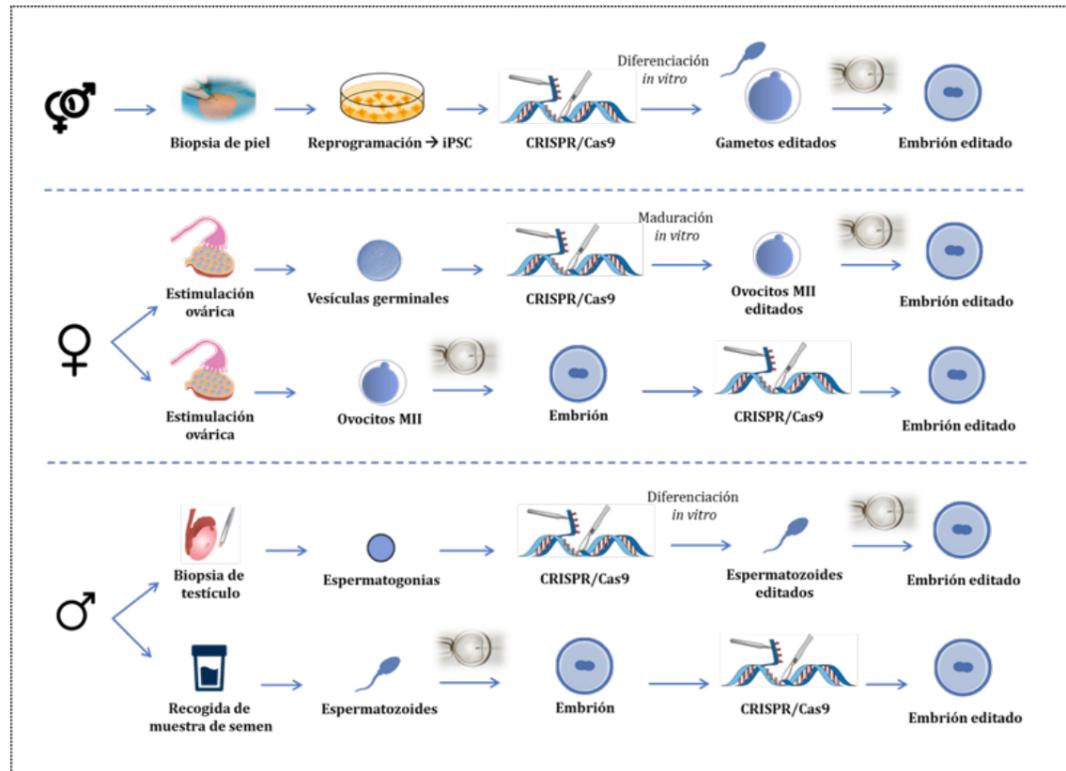


Figura 2. Diferentes estrategias para editar la línea germinal, tanto en mujeres como varones. Abreviaturas: iPSC, células madre pluripotentes inducidas; MII, metafase II. Esquema de elaboración propia. Fuente: (Vassena et al., 2016).

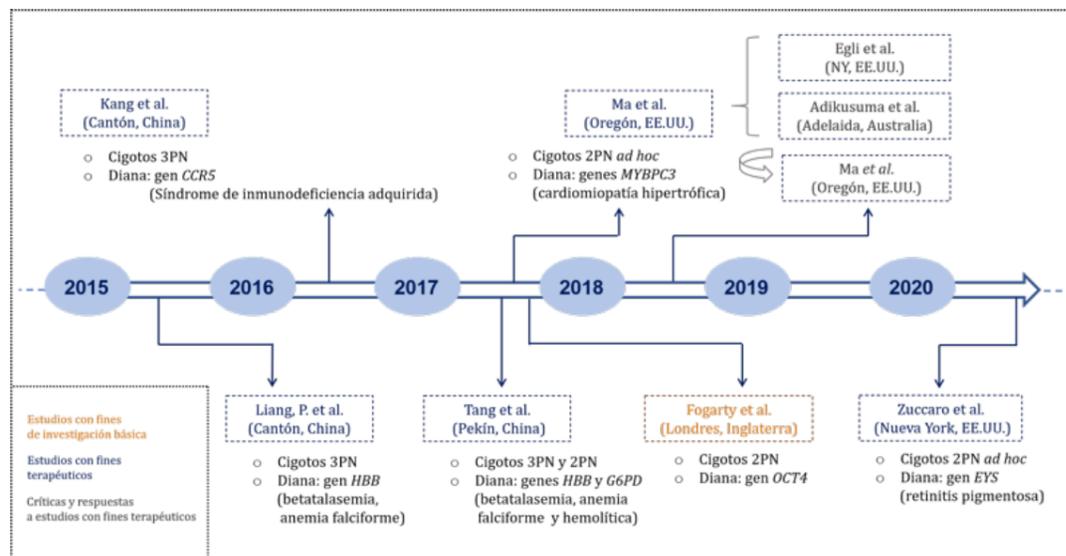


Figura 3. Cronograma de la edición genética de embriones humanos empleando la tecnología CRISPR/Cas9. Esquema de elaboración propia.

AULA JOVEN

Cronología de la edición genética en embriones humanos:
Desde la tecnología CRISPR/CAS9 hacia nuevas estrategias mejoradas



Figura 4. Interpretación de los experimentos de Ma et al., 2017. En los embriones generados, el alelo materno sano (negro) es utilizado como molde para reparar el alelo paterno (gris) puntualmente mutado (asterisco rojo). En consecuencia, solo aparece una banda en el gel de agarosa tras la amplificación por PCR. Esquema de elaboración propia.

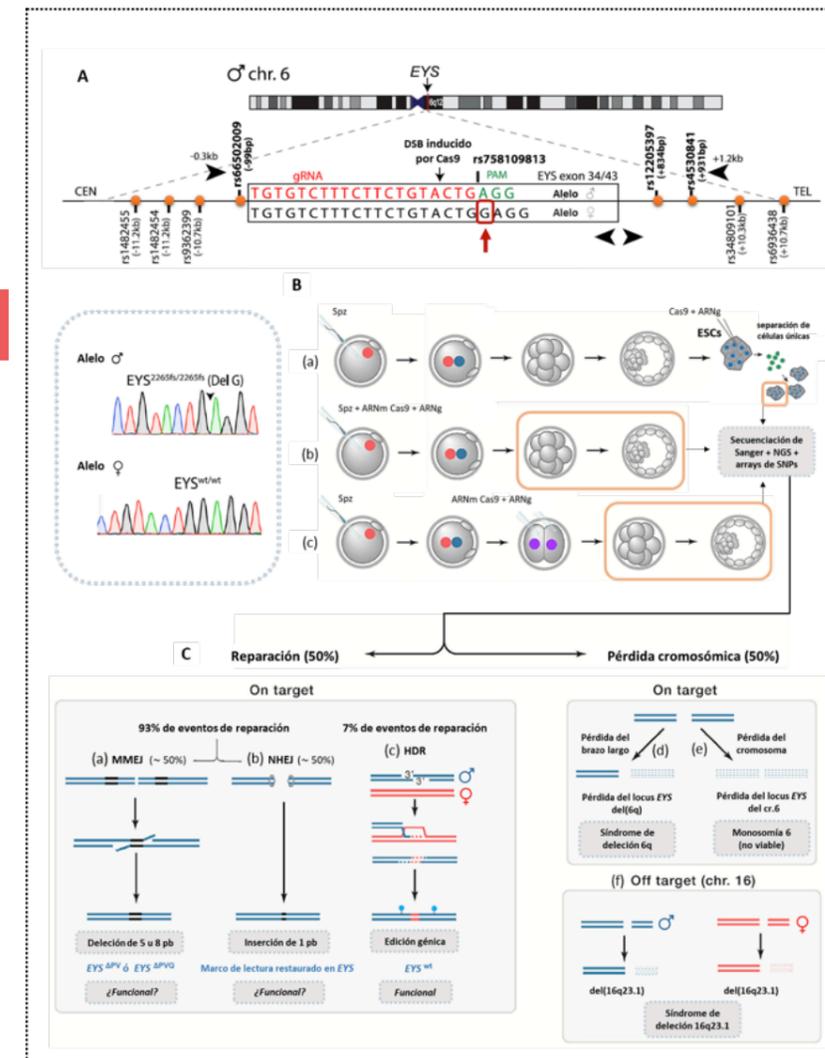


Figura 5. Trabajos de corrección de una mutación puntual (del G) en el locus *EYS* (rs758109813) mediante CRISPR/Cas9 en ESCs y embriones humanos por parte de Zuccaro et al., 2020. (A) Representación del locus *EYS* en el cromosoma 6 humano. Alineamiento de los alelos paterno y materno, nucleótido de guanina deleciónado en el alelo mutado (recuadrado en rojo), ARNg y SNPs flanqueantes (puntos en naranja). Los triángulos negros representan los cebadores empleados para la amplificación por PCR (parte superior) y las secuenciaciones por los métodos de Sanger y NGS (parte inferior) de los fragmentos amplificados on-target. (B) Grupos experimentales. (a) Transfección del sistema CRISPR sobre ESCs derivadas de blastocistos. (b) Comicroinyección del esperma y el sistema CRISPR sobre ovocitos MII. (c) Inyección del sistema CRISPR sobre embriones en estadio de 2 células. (C) Resultados de secuenciación y análisis del contenido cromosómico en los embriones. Reparación on-target por MMEJ (a), NHEJ (b) y HDR (c). Pérdidas cromosómicas on-target (d, e) y off-target (f). Abreviaturas: del, deleción; MMEJ, Microhomology-Mediated End Joining; NHEJ, Non-Homologous End Joining; HDR, Homology-Directed Repair. Esquema de elaboración propia. Fuente: (Hoffmann and Roig, 2020; Zuccaro et al., 2020).

AULA JOVEN

Cronología de la edición genética en embriones humanos:
Desde la tecnología CRISPR/CAS9 hacia nuevas estrategias mejoradas

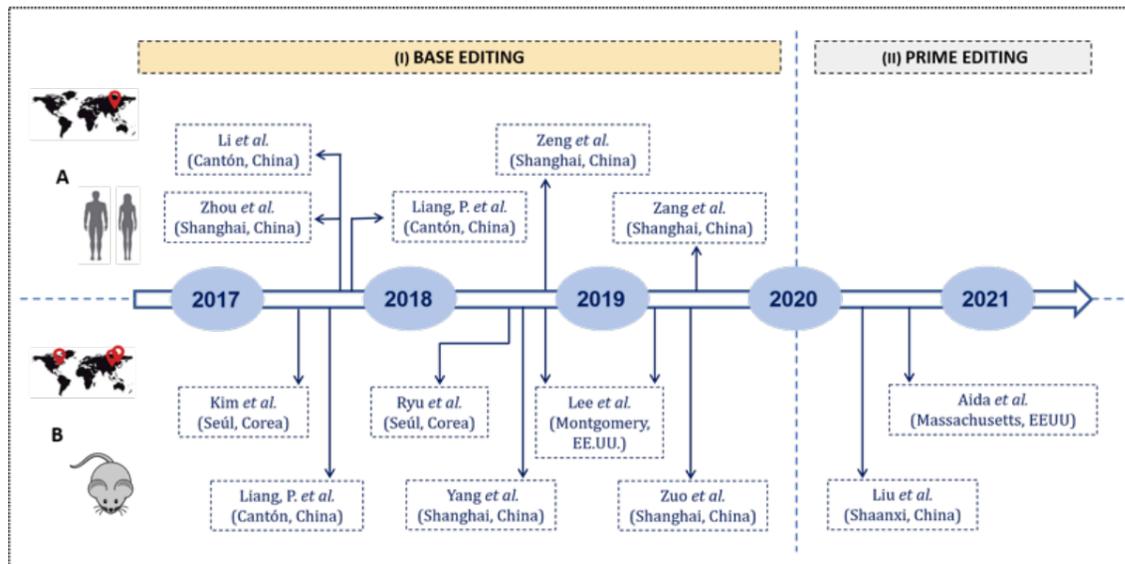


Figura 6. Cronograma de edición genética en embriones mediante nuevas tecnologías. (I) Estudios de base editing. (II) Estudios de prime editing. (A) Estudios que emplean embriones humanos. (B) Estudios que utilizan embriones de ratón. Esquema de elaboración propia.

	Egli et al., 2018		Ma et al., 2018	
	Hipótesis	Argumento	Respuesta	Argumento
1ª crítica	Amplificación exclusiva del alelo sano	Incapacidad para detectar el alelo mutado al generarse deleciones en las secuencias complementarias de los cebadores de PCR 	No hay evidencia de la existencia de deleciones al amplificar con cebadores situados a mayores distancia del punto de corte de la Cas9	La aparición de bandas de menor tamaño al esperado se atribuye a uniones inespecíficas de los cebadores a otras zonas del genoma
2ª crítica	Amplificación exclusiva del alelo sano en embriones partenogénicos	Aproximadamente un 10% de los cigotos generados mediante ICSI experimentan una pérdida del genoma paterno 	Un 10% de embriones partenogénicos no justifican la alta tasa de éxito reportada	La existencia de SNPs evidencia la presencia de los genomas paterno y materno en la mayoría de los embriones editados
3ª crítica	El alelo materno sano no puede servir como molde para la corrección del alelo paterno mutado	Separación física de los núcleos paterno y materno hasta el embrión en estadio de 2 células 	Los reactivos CRISPR pueden permanecer activos tras la primera división del cigoto	Los componentes CRISPR no desaparecen y actúan una vez que los núcleos paterno y materno han formado el genoma del cigoto

Tabla I. Principales críticas de Egli y colaboradores (Egli et al., 2018) contra Ma et al., 2017 y respectivas respuestas de los autores frente a cada una de ellas (Ma et al., 2018). Esquema de elaboración propia.

AULA JOVEN

Cronología de la edición genética en embriones humanos:
Desde la tecnología CRISPR/CAS9 hacia nuevas estrategias mejoradas

BIBLIOGRAFÍA

Adikusuma F, Piltz S, Corbett MA, Turvey M, McColl SR, Helbig KJ et al. Large deletions induced by Cas9 cleavage. *Nature* 2018; 7717: E8-E9.

Adikusuma F, Williams N, Grutzner F, Hughes J, Thomas P. Targeted Deletion of an Entire Chromosome Using CRISPR/Cas9. *Mol Ther* 2017; 8: 1736-1738.

Aida T, Wilde J, Yang L, Hou Y, Li M, Xu D et al. Prime editing primarily induces undesired outcomes in mice. *BioRxiv* 2020.

Alanis-Lobato G, Zohren J, McCarthy A, Fogarty N, Kubikova N, Hardman E et al. Frequent loss-of-heterozygosity in CRISPR-Cas9-edited early human embryos. *BioRxiv* 2020.

Anzalone AV, Koblan LW, Liu DR. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat Biotechnol* 2020; 7: 824-844.

Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 2019; 7785: 149-157.

Baumann K. Genome editing: CRISPR-Cas becoming more human. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017; 10: 591.

Egli D, Zuccaro MV, Kosicki M, Church GM, Bradley A, Jasin M. Inter-homologue repair in fertilized human eggs? *Nature* 2018; 7717: E5-E7.

Fogarty NME, McCarthy A, Snijders KE, Powell BE, Kubikova N, Blakeley P et al. Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature* 2017; 7674: 67-73.

Greenfield A. Carry on editing. *Br Med Bull* 2018; 1: 23-31.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012; 6096: 816-821.

Kang X, He W, Huang Y, Yu Q, Chen Y, Gao X et al. Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *J Assist Reprod Genet* 2016; 5: 581-588.

Kantor A, McClements ME, MacLaren RE. CRISPR-Cas9 DNA Base-Editing and Prime-Editing. *Int J Mol Sci* 2020; 17: 6240

Kim K, Ryu SM, Kim ST, Baek G, Kim D, Lim K et al. Highly efficient RNA-guided base editing in mouse embryos. *Nat Biotechnol* 2017; 5: 435-437.

Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 2016; 7603: 420-424.

Lee HK, Willi M, Miller SM, Kim S, Liu C, Liu DR et al. Targeting fidelity of adenine and cytosine base editors in mouse embryos. *Nat Commun* 2018; 1: 4804-018-07322-7.

Lee HK, Willi M, Smith HE, Miller SM, Liu DR, Liu C et al. Simultaneous targeting of linked loci in mouse embryos using base editing. *Sci Rep* 2019; 1: 1662-018-33533-5.

Li G, Liu Y, Zeng Y, Li J, Wang L, Yang G et al. Highly efficient and precise base editing in discarded human tripronuclear embryos. *Protein Cell* 2017; 10: 776-779.

Liang P, Ding C, Sun H, Xie X, Xu Y, Zhang X et al. Correction of beta-thalassemia mutant by base editor in human embryos. *Protein Cell* 2017; 11: 811-822.

Liang P, Sun H, Sun Y, Zhang X, Xie X, Zhang J et al. Effective gene editing by high-fidelity base editor 2 in mouse zygotes. *Protein Cell* 2017; 8: 601-611.

Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell* 2015; 5: 363-372.

Liu Y, Li X, He S, Huang S, Li C, Chen Y et al. Efficient generation of mouse models with the prime editing system. *Cell Discov* 2020; 27-020-0165-z.

Luís Montoliu. Editando genes: recorta, pega y colorea. Las maravillosas herramientas CRISPR. España:Next Door Publishers S.L.; 2019.

Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW, Wu J, Hayama T, Darby H et al. reply. *Nature* 2018; 7717: E10-E23.

Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW, Wu J, Lee Y, Suzuki K et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature* 2017; 7668: 413-419.

National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, Policy and Global Affairs. Second International Summit on Human Genome Editing: Continuing the Global Discussion. Washington (DC): National Academies Press (US); 2019.

Perisse IV, Fan Z, Singina GN, White KL, Polejaeva IA. Improvements in Gene Editing Technology Boost Its Applications in Livestock. *Front Genet* 2021; 11:614688.

Ryu SM, Koo T, Kim K, Lim K, Baek G, Kim ST et al. Adenine base editing in mouse embryos and an adult mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Biotechnol* 2018; 6: 536-539.

Tang L, Zeng Y, Du H, Gong M, Peng J, Zhang B, Lei M, Zhao F, Wang W, Li X et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein. *Mol Genet Genomics* 2017; 3: 525-533.

Vassena R, Heindryckx B, Peco R, Pennings G, Raya A, Sermon K

AULA JOVEN

*Cronología de la edición genética en embriones humanos:
Desde la tecnología CRISPR/CAS9 hacia nuevas estrategias mejoradas*

et al. Genome engineering through CRISPR/Cas9 technology in the human germline and pluripotent stem cells. Hum Reprod Update 2016; 4: 411-419.

Wen L, Liu Q, Xu J, Liu X, Shi C, Yang Z et al. Recent advances in mammalian reproductive biology. Sci China Life Sci 2020; 1: 18-58.

Yang L, Zhang X, Wang L, Yin S, Zhu B, Xie L et al. Increasing targeting scope of adenosine base editors in mouse and rat embryos through fusion of TadA deaminase with Cas9 variants. Protein Cell 2018; 9: 814-819.

Zeng Y, Li J, Li G, Huang S, Yu W, Zhang Y et al. Correction of the Marfan Syndrome Pathogenic FBN1 Mutation by Base Editing in Human Cells and Heterozygous Embryos. Mol Ther 2018; 11: 2631-2637.

Zhang M, Zhou C, Wei Y, Xu C, Pan H, Ying W et al. Human cleaving embryos enable robust homozygotic nucleotide substitutions by base editors. Genome Biol 2019; 1: 101-019-1703-6.

Zhou C, Zhang M, Wei Y, Sun Y, Sun Y, Pan H et al. Highly efficient base editing in human tripronuclear zygotes. Protein Cell 2017; 10: 772-775.

Zuccaro MV, Xu J, Mitchell C, Marin D, Zimmerman R, Rana B et al. Allele-Specific Chromosome Removal after Cas9 Cleavage in Human Embryos. Cell 2020; 6: 1650-1664.e15.

Zuo E, Huo X, Yao X, Hu X, Sun Y, Yin J et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted chromosome elimination. Genome Biol 2017; 1: 224-017-1354-4.

Zuo E, Sun Y, Wei W, Yuan T, Ying W, Sun H et al. Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos. Science 2019; 6437: 289-292.



Nace la primera RED de muestras biológicas

- La única RED nacional que cubre las principales capitales de la península, baleares y canarias.
- Todo el personal, los vehículos y las gestiones están certificados, formados y adaptados para el transporte de muestras.
- Contamos con el único seguro de muestras que se ha dado de alta en nuestra país, totalmente único e innovador. Que cubre todo tipo de muestras.
- Tendremos almacenamiento en frío de muestras.
- Tenemos un innovador sistema de trazabilidad adaptado para cada necesidad que el cliente precise.
- Contamos con la ISO Transporte de muestras biológicas a nivel nacional e internacional.
- Podrá conocer en tiempo real la posición de su envío.
- Departamento especializado para atención y traslados de pacientes.

y además....

- Olvide la manipulación incorrecta.
- El desconocimiento del tipo de mercancía y condiciones que precisan sus muestras.
- Olvide el trato de conductores, que no dan valor a la importancia que estas tienen para sus pacientes.
- Ofrezcale a sus pacientes el servicio que cumple íntegramente la normativa y la mejor solución para el traslado de sus muestras.
- Evite las altas temperaturas con envíos controlados.

96 182 66 42 - info@lab-courier.com

AULA JOVEN

NEO-OVOGÉNESIS Y CÉLULAS MADRE GERMINALES, ¿DESAFIANDO AL DOGMA?

NEO-OOGENESIS AND GERMINAL STEM CELLS, CHALLENGING DOGMA?

Lucía Chico-Sordo. Fundación IVI-IIS La Fe, IVI Madrid, Av. del Talgo 68-70, 28023 Madrid
Lucia.chico@ivirma.com

► RESUMEN

La doctrina básica en biología reproductiva sostiene que las hembras de mamíferos nacen con una reserva ovárica finita. Con la edad, y debido a la sucesión de los ciclos ováricos, esta reserva se va agotando hasta que las mujeres alcanzan la menopausia. Sin embargo, dentro de la comunidad científica ha nacido una corriente que se opone a la aceptación de este dogma y creen que existe un fenómeno de neo-ovogénesis. Esta teoría revolucionaria se apoya en la existencia de células madre germinales en el ovario de mamíferos adultos, que actúan como una fuente en la renovación folicular. Son múltiples y variados los estudios que se han llevado a cabo tanto a favor como en contra de la teoría de la neo-ovogénesis. En estos estudios se ha trabajado con distintas especies de mamíferos, sobre todo roedores. Hoy en día, la situación es controvertida, el debate aún está abierto lo que provoca una polarización en las opiniones de los científicos. Sin embargo, una cosa está muy clara, y es que, si se demuestra la existencia de este fenómeno de neo-ovogénesis y de las células madre germinales, supondría un gran cambio y progreso en la biología reproductiva.

PALABRAS CLAVE: neo-ovogénesis, ovario de mamíferos, células germinales primordiales, células madre del ovario, células madre de la línea germinal, ovocito y regeneración ovárica.

► ABSTRACT

The basic doctrine in reproductive biology maintains that mammalian females are born with a finite ovarian reserve. With age, and due to the succession of ovarian cycles, this reserve runs out until women reach menopause. However, within the scientific community has born a current that opposes the acceptance of this dogma and believe that there is a phenomenon of neo-oogenesis. This revolutionary theory is supported by the existence of germ line stem cells in the ovary of adult mammals, which act as a source of follicular renewal. There are many and varied studies that have been carried out both for and against the theory of neo-oogenesis. In these studies, they have worked with different species of mammals, especially rodents. Nowadays, the situation is controversial; the debate is still open, which causes a polarization in the opinions of scientists. However, one thing is very clear, and that is, if the existence of this phenomenon of neo-oogenesis and germ stem cells is proven, it would be a great change and progress in reproductive biology.

KEY WORDS: neo-oogenesis, mammalian ovary, primordial germ cells, ovarian stem cells, germ line stem cells, oocyte and ovarian regeneration

1. INTRODUCCIÓN

Desde el trabajo de revisión realizado por Zuckerman en 1951, en biología reproductiva se ha mantenido la teoría de que los mamíferos nacen con una reserva ovárica finita. Es decir, que el proceso de formación de las células germinales femeninas, conocido como ovogénesis, queda relegado al período neonatal. En la especie humana, las mujeres nacen con un número limitado de folículos primordiales en el ovario que madurarán a lo largo de su período fértil (Zuckerman 1951). Esto implica que una mujer posee una dotación de folículos finita, y cuando esta reserva se agote será imposible su recuperación, alcanzándose así la menopausia (Kelsey et al. 2011). Sin embargo, en las últimas décadas ha nacido una corriente que se opone a la aceptación de este dogma, cuestionando si en realidad la capacidad reproductiva femenina viene definida de manera absoluta por el número de folículos primordiales desarrollados antes del nacimiento, o si el ovario adulto tiene la capacidad de renovación de las células germinales (Gosden 2013). Se han aportado evidencias de la existencia de una línea germinal continua en ovarios de algunos mamíferos como prosimios y ratones, estudios que han impulsado y promovido la búsqueda de células similares en el ovario humano adulto (Telfer 2004, Telfer and Anderson 2019). Como consecuencia de explorar la posibilidad de que exista un proceso de ovogénesis postnatal en mamíferos, la comunidad científica ha dividido sus opiniones (Tilly et al. 2009).

Esta polarización entre los científicos ha generado un profundo debate en torno a la existencia o no de un proceso de ovogénesis postnatal que implicaría grandes esperanzas en el campo de la salud y fertilidad femenina. El objetivo principal de este artículo es analizar los estudios experimentales realizados que apoyen o refuten la teoría de la neo-ovogénesis, con el fin de aportar luz sobre un debate tan extendido.

2. DOGMA CENTRAL DE LA BIOLOGÍA REPRODUCTIVA

La hipótesis que limita el proceso de ovogénesis a la etapa prenatal y que mantiene que las mujeres nacen con una reserva ovárica finita, fue expuesta por primera vez durante la década de 1920. Pearl y Schoppe afirmaron que el número de ovocitos no aumenta durante la vida del individuo, sus conclusiones se basaron en el recuento de ovocitos de los ovarios de las aves en edad reproductiva (Pearl and Schoppe 1921). Pero no fue hasta la publicación del artículo de Zuckerman en 1951, donde el debate se detuvo y se instauró el dogma de una reserva fija de ovocitos establecida al momento del nacimiento (Zuckerman 1951). En esta línea, Peters et al. en 1962 llegaron a la misma conclusión en ratones, demostrando que

la formación de ovocitos se produce solo en el periodo fetal, disminuyendo con la edad y alcanzando el agotamiento cuando llega la menopausia. Para ello, investigaron la síntesis de ADN en ovocitos de ratón utilizando un precursor de ADN radioactivo (timidina marcada con tritio), inyectada en diferentes días de gestación. Sus resultados revelaron que la síntesis de ADN de células germinales se volvió insignificante en el día 18 del desarrollo embrionario. Aunque este estudio tenía una gran limitación ya que los ratones no se estudiaron después del nacimiento, por lo que no se podía extraer la conclusión directa de que no está ocurriendo ovogénesis postnatal (Peters et al. 1962).

En términos cuantitativos se estima que al nacer hay entre 500,000 y 1,000,000 de folículos primordiales en estado quiescente (cada uno de ellos alberga en su interior un ovocito primario detenido en estadio de diploteno de la primera profase meiótica). Pero este número disminuye rápidamente como consecuencia de la activación mensual de una cohorte de unos 1,000 folículos primordiales durmientes que inician su crecimiento, en respuesta a mecanismos intraováricos. De forma que, a los 38 años quedan aproximadamente 25,000 folículos restantes en los ovarios de las mujeres. De la cohorte seleccionada para el crecimiento y desarrollo folicular de cada mes, tan solo unas decenas llegan al estadio de folículo antral, susceptibles de estimulación para la producción de ovocitos maduros. A partir de los 38 años, la reserva ovárica disminuye cada vez más rápido hasta alcanzar unos 1,000 folículos primordiales a los 50 años, acompañado de grandes irregularidades en el ciclo menstrual (Hansen et al. 2008, Kelsey et al. 2011). A lo largo de la vida, la mayoría de los folículos se vuelven atrésicos, teniendo en cuenta que, en un ciclo ovárico natural, de 300 folículos solo 1 de ellos madura hasta folículo de Graaf y es ovulado. Por tanto, cuando el número de folículos en el ovario es tan pequeño que no puede soportar este proceso de selección de dominación y ovulación mensual, llega la menopausia (Gosden et al. 1983, Richardson et al. 1987, Byskov et al. 2005, Hsueh et al. 2015). La duración del periodo fértil que se inicia con la pubertad y termina con la menopausia, viene determinada por el tamaño de la reserva ovárica, la tasa de muerte de los folículos primordiales antes de ser seleccionados y su tasa de activación. Los dos últimos parámetros están influenciados por factores ambientales y repercutirán en la reserva ovárica, ya que progresivamente reducirán el periodo fértil (Wallace and Kelsey 2010, Findlay et al. 2015).

La especie humana tiene una baja eficiencia reproductiva en comparación con el resto de los mamíferos, ya que la mujer solo ovula un ovocito por ciclo. Mientras que ocurra la ovulación, existen probabilidades de concepción, sin embargo, la probabilidad disminuye a medida que se incrementa la edad.

A esto hay que sumar el hecho de que teniendo en cuenta que estos ovocitos se formaron antes del nacimiento, a mayor edad de la mujer mayor edad de esos ovocitos, los cuales irán acumulando defectos celulares, anomalías cromosómicas y deterioros funcionales que pueden acabar en abortos involuntarios de embarazos (Nybo et al. 2000).

3. NEO-OVOGÉNESIS

¿Están todos los ovocitos presentes en el ovario al nacer u ocurre un proceso de ovogénesis continuo durante la vida posnatal? Esta pregunta fue debatida desde finales del siglo XIX hasta mediados del siglo XX. Con la publicación del artículo de Zuckerman se pensó que la controversia llegaría a su fin. Durante más de 50 años, han prevalecido estas conclusiones, pero existen grupos cuyas líneas de investigación se oponen a esta hipótesis. Todos los estudios sobre la neo-ovogénesis difieren en múltiples aspectos, pero son consistentes en sus conclusiones, aportan resultados positivos que contradicen al dogma. A lo largo de este epígrafe se analizarán diferentes artículos, separados temporalmente y muy variados en sus metodologías, pero que de una forma u otra apoyan la teoría de la ovogénesis postnatal.

Los primeros estudios que plantearon la hipótesis de que existe una fuente renovable de células madre adultas en los ovarios fueron realizados en ratón (Kingery 1917, Allen 1923) y primates inferiores (Rao 1927). Estos estudios argumentaban que los nuevos ovocitos surgen del epitelio germinal del ovario adulto como resultado de la división mitótica de las células indiferenciadas. Sobre ellos se cimentaron posteriores artículos en defensa de la neo-ovogénesis. Uno de los artículos más importantes, con el que resurge el concepto de neo-ovogénesis es el publicado por Johnson y colaboradores en 2004, que basándose en que organismos invertebrados como *Drosophila melanogaster* poseen células madre germinales (GSCs) que mantienen la producción de ovocitos en ovarios adultos, propone la existencia de células germinales activas mitóticamente localizadas en la capa de células epiteliales superficiales que cubren el ovario de ratón. Gracias a estos trabajos detonantes, se iniciaron y retomaron muchas líneas de investigación con el fin de aclarar este debate, polarizando a la comunidad científica. Actualmente, los estudios pueden dividirse en dos tipos, (1) los que respaldan la presencia de células germinales en el ovario (Johnson et al. 2004, Bukovsky et al. 2005, Kerr et al. 2006, Virant-Klun et al. 2008, Zhang et al. 2008, Niikura et al. 2009, Zou et al. 2009, Pacchiarotti et al. 2010, Parte et al. 2011, Esmaeilian et al. 2012, White et al. 2012, White et al. 2012, Bhartiya et al. 2013, Parte et al. 2013, Bui et al. 2014, Sriraman et al. 2015, Ding et al. 2016, Guo et al. 2016, Silvestris et al. 2018) y (2) los que refutan esta teoría (Bristol-

Gould et al. 2006, Liu et al. 2007, Zhang et al. 2010, Byskov et al. 2011, Notarianni 2011, Kerr et al. 2012, Oatley and Hunt 2012, Zhang et al. 2012, Lei and Spradling 2013, Yuan et al. 2013, Zhang et al. 2014, Zhang et al. 2015, Vanni et al. 2017, Wagner et al. 2020), que sostienen que los datos se han malinterpretado o son erróneos y aportan explicaciones alternativas para esos hallazgos.

3.1. ESTUDIOS EN ROEDORES

La población que reúne el mayor número de publicaciones sobre neo-ovogénesis son los roedores, especie que comparte gran parte de su genoma con el ser humano. El concepto neo-ovogénesis resurge de la mano de Johnson et al. y sus estudios en ratones (Johnson et al. 2004), que a pesar de ofrecer resultados tan esperanzadores y prometedores, tiene sus detractores que se oponen con firmeza al proceso de ovogénesis postnatal y con el objetivo de refutar sus conclusiones, aportan explicaciones alternativas a sus resultados (Notarianni 2011).

A continuación, se analizarán artículos con experimentos de distinta naturaleza, estructurados en bloques atendiendo al principio y objetivo de sus experimentos: razonamientos matemáticos, identificación y localización de células madre germinales, reducción de la reserva folicular con el uso de agentes citotóxicos, y trasplantes de células putativas marcadas con GFP para recuperar la función ovárica.

3.1.1. Razonamientos matemáticos:

Johnson et al. (2004) en su estudio evaluaron el número de folículos sanos y degenerativos en ovarios de ratón mediante métodos matemáticos y observaron que existía una discordancia entre el número de folículos sanos y la incidencia de atresia en el ovario postnatal de ratón. En su razonamiento parten de que, si el conjunto total de folículos maduros sanos es inferior a 4,000 folículos/ovario en la pubertad, y en este mismo momento se detectan entre 700 y 1,300 folículos atrésicos inmaduros, se estima una tasa de atresia de un 33%, lo que produciría el agotamiento completo de la reserva folicular en unas semanas, un tiempo más corto que el tiempo en el que realmente ocurre. Los ratones con 12 meses de edad poseen folículos primordiales y de crecimiento temprano, lo que solo tendría explicación si existiera una fuente continua que renueve y mantenga el conjunto de folículos (Johnson et al. 2004). Pero esta evidencia ha sido criticada, argumentando que la presencia de folículos atrésicos no se puede utilizar en sí misma para estimar cuántos folículos se van a volver atrésicos por unidad de tiempo en un futuro, porque se trata de un cálculo estático y no dinámico (Byskov et al. 2005).

Por tanto, si el fallo reside en que los cálculos son dependientes de una estimada tasa de atresia, para evitar esto lo adecuado sería tener en cuenta solo los cambios en el número de folículos no atrésicos durante la vida de ratones adolescentes y adultos tempranos, evitando el parámetro de folículos atrésicos. En el estudio de Kerr et al. se cuantificaron los folículos sanos desde el día 1 al 200 y se observó que en la primera semana postnatal había un marcado agotamiento de los folículos, mientras que desde el día 7 al día 100 de edad (13 semanas) el número promedio de folículos primordiales se mantuvo estable, a pesar de que debería haber disminuido significativamente motivado por el reclutamiento de los folículos en crecimiento (Kerr et al. 2006). Este estudio, sin embargo, no aportó una prueba definitiva de la presencia de células madre de la línea germinal ovárica en ratón adulto, pero sí sugirió la existencia de un mecanismo desconocido que contribuye a la renovación folicular. Aun así, este estudio fue objeto de debate, ya que se le acusa de proporcionar resultados ambiguos que llevan a una interpretación estadística errónea, puesto que sus conclusiones están basadas en intervalos de confianza en lugar de programas estadísticos estándar basados en el p-valor. De hecho, se propuso como mejora el aumento del tamaño de la muestra para reducir los intervalos de confianza y hacer inferencias estadísticas más precisas y exactas (Faddy and Gosden 2007).

3.1.2. Identificación y localización de células madre germinales putativas:

Los razonamientos matemáticos han empujado a la hipótesis de que existen células en el ovario de ratón postnatal que son capaces de reemplazar los ovocitos perdidos por atresia y ovulación, manteniendo así un conjunto estable de folículos. Pero ¿cuáles son las células candidatas a células madre germinales? ¿dónde se encuentran estas células? y ¿qué características deben tener?

En estudios anteriores a Zuckerman, se propuso que la renovación de los ovocitos degenerados tenía lugar a partir de células del epitelio germinal del ovario adulto (Kingery 1917, Allen 1923). Pero fueron los estudios de Johnson et al. (2004), y Zou et al. (2009) los que consiguieron mediante análisis histológico y tinciones inmunohistoquímicas, identificar y aislar unas células candidatas grandes ovoides en la capa de células epiteliales superficiales que cubren al ovario de ratones adultos. En primer lugar, se identificaron y localizaron usando el marcador MVH o DDX4 (DEAD-box helicase 4) característicos de línea germinal en todos los vertebrados, y se analizó la capacidad de proliferación celular con la adición de BrdU, un

nucleósido sintético que se incorpora al ADN recién formado. Se observó la presencia de células doble positivas para MVH y BrdU en el epitelio del ovario, aunque cada autor las denominó de una forma diferente, Johnson et al. las nombraron células madre germinales (GSC, del inglés Germ Stem Cells), mientras que Zou et al. se refirieron a ellas como FGSC (del inglés Female Germline Stem Cells), células madre de la línea germinal femenina (Zou et al. 2009). Notarianni (2011) en su artículo aporta una explicación alternativa a la detección de BrdU en las células candidatas a células madre germinales. Razona que la incorporación de BrdU no se debe a las divisiones mitóticas de estas células como células madre de la línea germinal, sino que puede deberse a la existencia de la síntesis de ADN mitocondrial en estas células, o incluso a la recombinación y reparación del ADN en etapas posteriores, siendo ambos procesos detectados por la incorporación de BrdU (Notarianni 2011). La misma autora plantea también que las células positivas para MVH, son ovocitos en tránsito a través del epitelio superficial del ovario durante la exfoliación, en lugar de afirmar la existencia de un epitelio germinal.

Para medir su capacidad proliferativa es necesario que expresen genes involucrados en el inicio de la meiosis, marcadores de la línea germinal, marcadores de pluripotencia y que sean capaces de proliferar tras su aislamiento y cultivo. Se detectó la expresión de los 3 genes relacionados con la meiosis: SCP3 (proteína 3 del complejo sinaptonémico necesaria para la formación de los elementos laterales axiales que lo componen), SPO11 (endonucleasa) y DMC1 (recombinasa) (Johnson et al. 2004). A su vez, se consiguió aislar estas células de ratones adultos y neonatales mediante digestión enzimática y aislamiento inmunomagnético para su cultivo y creación de dos líneas celulares, nFGSC (neonatal) y aFGSC (adulto) que a su vez se caracterizaron viendo que expresaban OCT-4, MVH, DAZL, BLIMP1, FRAGILIS, STELLA y REX-1, y no expresaban c-KIT, FLIGA, SOX-2, NANOG, SCP1-3 o ZP3 (Zou et al. 2009). Pacchiarotti et al. (2010) consiguieron purificar y caracterizar GSC, llevarlas a cultivo e incluso conseguir su diferenciación en cuerpos embrioides (EB, del inglés Embryoid bodies) que expresaban marcadores específicos para las 3 capas germinales, y a su vez se indujo la diferenciación de estos EB en otros tipos celulares, lo que las dotaba de características multipotentes. Estos resultados permitían concluir que se trataba de una línea con características de células madre, marcada por una alta actividad telomerasa (enzima que añade de novo repeticiones teloméricas en el extremo de los cromosomas), con cariotipo normal y que fueron capaces de derivar a su vez líneas celulares.

3.1.3. Reducción de la reserva de folículos con agentes citotóxicos:

Todos los experimentos anteriores concluyen que existe una población de células que actúa como fuente de renovación folicular en el ovario adulto, y se aportan evidencias sobre posibles células candidatas. Sin embargo, estos experimentos en su mayoría están basados en datos observacionales, pero no se ha demostrado esa capacidad de renovación in situ. Por tanto, teniendo en cuenta que se debe probar su capacidad proliferativa, el experimento que podría demostrar esto consiste en eliminar las células germinales del ovario y observar una regeneración de estas. Para ello, se utilizaron agentes citotóxicos que atacan a las células germinales como el busulfán o la doxorubicina. El tratamiento con busulfán, un agente acondicionador utilizado en la preparación de los machos como receptores de un trasplante, se administró en los días 25 y 35 en ratones hembra durante la ventana de proliferación de células germinales del ovario fetal. Se compararon dos grupos, el grupo de ratones tratados con busulfán y el grupo no tratado o control. Se recolectaron los ovarios 10 días después de la administración para analizar los cambios en el número de folículos primordiales sanos, y se observó que los ovarios tratados con busulfán poseían menos del 5% del acervo de folículos primordiales presente en los ovarios no tratados. En los ovarios expuestos a busulfán se conservó un aspecto histológico normal, incluyendo la presencia de folículos sanos en maduración con ovocitos no degenerados en su interior, y la presencia de cuerpos lúteos (indicativo de ovulación) (Johnson et al. 2004).

Los mismos autores realizaron otro experimento con doxorubicina, un medicamento quimioterapéutico que a diferencia del busulfán muestra aparente selectividad citotóxica en el linaje germinal femenino para ovocitos y células germinales no replicativas. La doxorubicina se administró mediante una inyección única, y 24 horas después la reserva de folículos primordiales se había reducido en más del 80%, y una vez agotada por completo, tan solo se tardó 12-24 horas en su reposición. Esta reserva fue comparada con un grupo control de la misma edad que nunca se había expuesto a la droga, y a los 2 meses la reserva era la misma en ambos grupos (Johnson et al. 2005). Con ambos estudios se refuerza el concepto de que las células germinales proliferativas persisten en el ovario adulto y que son requeridas en la renovación continua del conjunto folicular.

3.1.4. Trasplantes de células putativas marcadas con GFP:

El último tipo de experimentos que se llevaron a cabo para probar la existencia de estas células germinales proliferativas consistió en trasplantes o injertos donde participaban de una u otra forma la proteína verde fluorescente GFP, que permitía realizar un seguimiento de las células de interés en cada uno de los experimentos. Uno de los pioneros fue Johnson et al. (2004), en su experimento injertaron fragmentos ováricos de ratones transgénicos que expresaban el gen GFP, como resultado de este trasplante se visualizaron ovocitos que expresaban GFP rodeados de células de la granulosa negativas para el marcaje. Por tanto, los ovocitos provenían de los ratones transgénicos receptores del injerto, pero las células que los rodeaban tenían su origen en el propio injerto. Todo esto indicaba que las células germinales transgénicas se habían infiltrado en el tejido injertado, e iniciaron allí la foliculogénesis apoyándose en las células somáticas residentes (Johnson et al. 2004).

Zou et al. (2009) también utilizaron GFP en un experimento de trasplante, concretamente ellos partieron de las dos líneas de FGSC aisladas, la línea neonatal (nFGSC) y la adulta (aFGSC), e infectaron ambas con GFP. A continuación, trasplantaron estas líneas a los ovarios de hembras receptoras previamente esterilizadas con ciclofosfamida y busulfán. Dos meses más tarde se recogieron los ovarios de estas hembras receptoras y se procedió a su evaluación histológica, donde se pudo ver que los ovarios inyectados con FGSC tenían muchos ovocitos GFP positivos en diferentes etapas de desarrollo, mientras que en los ratones control sometidos a esterilización, pero sin la inyección de FGSC, no se observó nada. Es decir, se había conseguido ver que las FGSC (ambas líneas) eran capaces de proliferar, pero la pregunta era si realmente podían restablecer la fertilidad de estos receptores infértiles. Tras 75 – 110 días del trasplante, se reportó un 82% de receptores de nFGSC que obtuvieron descendencia por apareamiento natural con machos salvajes, y un 80% en el caso de los receptores de aFGSC. También se analizó la genética de la descendencia, esta no mostraba anomalías, expresaban en heterocigosis el transgén GFP, por lo que este se transmitía por la línea germinal, y eran totalmente fértiles (Zou et al. 2009). Este experimento se confirmó por Niikura et al. que injertaron tejido ovárico extraído de ratones que expresaban GFP en la línea germinal envejecida de ratones transgénicos, se injertaron en el saco

bursal de ovarios de hembras adultas jóvenes, y se detectó un pequeño número de células germinales positivas a GFP (Niikura et al. 2009). Años más tarde, a partir de ovarios de mujeres con trastorno de identidad de género que recibieron una reasignación de sexo, se aislaron células raras mitóticamente activas del tejido cortical ovárico, fueron expandidas in vitro y generaron espontáneamente ovocitos. Estas células candidatas fueron modificadas para que expresaran GFP, y se realizó un xenotrasplante en ratones hembra donde se observó la formación de folículos que contenían ovocitos positivos para GFP en su interior (White et al. 2012).

Todos los trabajos aquí expuestos han realizado trasplantes de las células madre germinales candidatas o directamente injertos de tejido ovárico, por el contrario, otros grupos han observado que tras el trasplante de médula ósea, también se han formado folículos primordiales con ovocitos en su interior (incluso con trasplantes de sangre periférica) (Johnson et al. 2005), y en algunos casos se ha llegado a restaurar la función ovárica como en los estudios de Lee et al. (2007). En este último estudio, se sometió a ratones hembras salvajes a quimioterapia y seguidamente se realizó un trasplante de médula ósea cuyos donantes eran también hembras transgénicas que expresaban GFP, y que no coincidían en el color del pelaje con la receptora. Tras el apareamiento con ratones macho, se registraron el número de gestaciones y el genotipo de los descendientes, y se vio que todas las crías derivaron de la línea germinal de la receptora. Por tanto, el trasplante de médula ósea rescató la fertilidad a largo plazo de hembras tratadas con quimioterapia. Un estudio similar a este se realizó en humanos, donde se analizó genéticamente una descendiente concebida por una paciente con anemia de Fanconi que recibió un trasplante de médula ósea de una donante no relacionada, tras un proceso de quimioterapia e irradiación toracoabdominal. Al analizar microsátélites polimórficos, se reveló un vínculo genético entre la hija y la madre, independientemente de la donante (Veitia et al. 2007).

3.2. ESTUDIOS EN HUMANOS

El artículo de Bukovsky et al. (2004) fue el primer artículo en trasladar la teoría de la neo-ovogénesis al ser humano, y cuestionar si existen células germinales en el ovario adulto. En este artículo se proponen las células mesenquimales de la túnica albugínea como progenitores de células germinales y células de la granulosa, ambos tipos celulares producidos en el epitelio superficial ovárico (Bukovsky et al. 2004). Y fue en su segundo artículo donde investigan esta posibilidad, es decir, si es posible la diferenciación de ovocitos y células de la granulosa a partir de un cultivo de ovarios humanos adultos. Para

ello partieron de células de la superficie de los ovarios, las cuales fueron cultivadas in vitro durante 5-6 días y se cultivaron en dos modalidades, con ausencia o presencia de estímulos estrogénicos que venían determinados por la ausencia o presencia de rojo fenol, respectivamente. Se observó que las células cultivadas sin rojo fenol daban lugar a células pequeñas de fenotipo granulosa y células de tipo epitelial, neural y mesenquimatosa de un tamaño aproximado de 15 μm , mientras que las células cultivadas en presencia de rojo fenol proliferaron a células de mayor tamaño (180 μm) de fenotipo similar a los ovocitos. Por tanto, con este estudio se confirmaron sus observaciones in vivo que mantenían la hipótesis de que las células de la superficie del ovario son una fuente bipotencial de células germinales y de la granulosa (Bukovsky et al. 2005).

Los estudios en humanos continuaron de la mano de Virant-Klun et al. que se centraron en la partenogénesis en el ovario humano. El objetivo principal de sus estudios fue aislar células madre putativas de raspados del epitelio del ovario para su cultivo, y posterior consecución de la ovogénesis in vitro y la posible formación de embriones partenogenéticos. Su población de estudio fueron mujeres postmenopáusicas que carecían de folículos y ovocitos. En sus experimentos parte de células del epitelio ovárico, concretamente de células redondas muy pequeñas (2-4 μm) que expresan los marcadores SSEA-4, OCT-4, NANOG, SOX-2 y c-KIT. El raspado era centrifugado por gradiente de densidad para cultivar estas pequeñas células, y se vio que efectivamente proliferaban y llegaban a formar estructuras similares a "cuerpos embrioides". Estas células mantenían características de células madre, ya que expresaban marcadores de pluripotencia y una alta actividad telomerasa que disminuía a medida que se prolongaba el cultivo en el tiempo. En conclusión, de estas pequeñas células que expresaban marcadores de células madre embrionarias y que fueron cultivadas, se obtuvieron estructuras embrioides, ovocitos y blastocistos ya que se llegaron a identificar estructuras similares a la zona pelúcida, vesícula germinal y corpúsculos polares (Virant-Klun et al. 2008, Virant-Klun et al. 2009). Pero el gran problema de estos experimentos reside en que, para la obtención de estas células, es necesario llevar a cabo un proceso muy abrasivo como es el raspado del epitelio ovárico. Sin embargo, Ding et al. demuestran que no es necesario acudir al epitelio de los ovarios para conseguir aislar células madre, sino que pueden recuperarse del fluido folicular debido a la presencia de fragmentos de tejido de la corteza ovárica en los aspirados foliculares. Y demostró que estas células eran también capaces de diferenciarse a ovocitos hasta la etapa de vesícula germinal mediante cultivo in vitro (Ding et al. 2016). Un artículo muy reciente consiguió aislar de mujeres menopáusicas células madre del ovario, y demostró mediante cultivo in vitro que podían diferenciarse a células similares a ovocitos,

las cuales expresaban marcadores de meiosis (Silvestris et al. 2018). Y es con este artículo con el que se reafirma un modelo de neo-ovogénesis ovárica postnatal que podría contribuir al desarrollo de nuevos enfoques para tratar la infertilidad femenina.

4. ARGUMENTOS CONTRADICTORIOS A LA NEO-OVOGÉNESIS

Como se ha podido ver en el epígrafe anterior, muchos estudios defensores de la teoría de la neo-ovogénesis han sido rebatidos, intentando aportar explicaciones alternativas para sus hallazgos. Todos estos artículos que se oponen a la neo-ovogénesis, mantienen las conclusiones de Zuckerman como dogma de la biología reproductiva, pero aportan evidencias más recientes basadas en los artículos de la segunda mitad del siglo XX.

En términos temporales, el primero de los trabajos que refuta la existencia de un mecanismo de neo-ovogénesis en hembras adultas de mamíferos es el elaborado por Bristol-Gould et al. en 2006. En este artículo se basan en un modelo matemático y posterior análisis estadístico de la dinámica de progresión folicular, y concluyeron que los mamíferos femeninos producen un número determinado de ovocitos en la vida fetal, y que su producción cesa después del nacimiento. Para alcanzar estas conclusiones, crearon dos modelos matemáticos, (1) uno que se ajustaba a una dinámica de reserva folicular fija, y (2) otro en el que intervenían las células madre en la renovación de esta reserva. Analizando ambos modelos llegaron a la conclusión de que el modelo fijo se ajustaba más a los datos experimentales observados, en los que se alcanza un número máximo de folículos primarios a los 6 meses de edad y luego este decae progresivamente con el avance del tiempo (Bristol-Gould et al. 2006). Sin embargo, este artículo a su vez ha tenido sus propios detractores, los cuales han detectado dos problemas claves: la exclusión en el estudio de la variable incidencia de la pérdida folicular por atresia y la omisión de la premisa de que finalmente la reserva ovárica se agota con la edad. En el primer caso, Tilly et al. aluden a que es posible representar los cambios en los números absolutos, pero si trabajas con números absolutos no se conoce su origen, el cual puede ser una progresiva decadencia de un fondo fijo de folículos o una caída brusca. Y en el segundo caso, el argumento que aportan es que en sus estudios, a pesar de apoyar la teoría de la neo-ovogénesis se acepta que con la edad se alcanza un agotamiento de la reserva provocado por una pérdida de folículos por atresia, y porque las células madre que renuevan la reserva ovárica están sometidas también a un proceso de senescencia (Tilly et al. 2009).

Posteriormente, fueron varios los estudios que fundamentaban la inexistencia de un proceso de neo-ovogénesis en la no identificación de genes pluripotenciales y meióticos en ovarios adultos de humano (Liu et al. 2007, Byskov et al. 2011). Estos estudios se basaban en un análisis de expresión génica que recoge la incapacidad para detectar la expresión de diversos marcadores para la replicación de células germinales y su entrada en meiosis, pero tenían una gran limitación, y es que con sus ensayos tampoco fueron capaces de detectar NOBOX en las mismas muestras de tejido. NOBOX es un gen que se expresa abundantemente en ovocitos primordiales, primarios y secundarios, y su no detección implicaría la ausencia de ovocitos inmaduros. Sin embargo, estos sí fueron detectados en análisis histológicos del tejido ovárico, por lo que esto arroja muchas dudas sobre la sensibilidad de sus ensayos (Tilly et al. 2009). Estudios sobre la no expresión de marcadores de línea germinal o pluripotencia también se llevaron a cabo en ratones, y sus conclusiones refutaban la neo-ovogénesis (Zhang et al. 2010, Zhang et al. 2012, Yuan et al. 2013, Zhang et al. 2015). El estudio de Kerr et al. (2012) indica que no se produjo neo-foliculogénesis en ratones tras el tratamiento de esterilización con doxorubicina o rayos gamma, negando así la existencia de las células madre germinales (Kerr et al. 2012).

Recientemente, Wagner et al. (2020) publicaron un artículo con el objetivo de aclarar si las células procedentes de la corteza ovárica humana propuestas como células madre oogoniales realmente tienen la capacidad de diferenciarse a ovocitos. En su estudio, mediante perfiles transcripcionales identificaron seis tipos celulares en la superficie ovárica, clasificando las células putativas como células perivasculares, descartando así la existencia de células madre de la línea germinal en los ovarios de mujeres adultas (Wagner et al. 2020).

5. CONCLUSIÓN

El tema de la neo-ovogénesis y la existencia de células madre germinales es todavía muy controvertido, son múltiples las publicaciones que se posicionan a favor o en contra de este fenómeno, dividiendo a la comunidad científica. No se puede concluir si existe o no este fenómeno en el ovario de mujeres adultas, porque no hay suficientes antecedentes de estudios en el ser humano como para corroborar su existencia, ya que la gran mayoría de estudios se han llevado a cabo en roedores. Sin embargo, sí se puede confirmar que son necesarios más estudios, que focalicen en las células madre germinales del ovario humano y sus interacciones con el ambiente ovárico, y que la comunidad científica unifique los criterios de identificación, caracterización, cultivo y proliferación de estas células.

AULA JOVEN

Neo-ovogénesis y células madre germinales, ¿desafiando al dogma?

BIBLIOGRAFÍA

- Allen, E. (1923). "Ovogenesis during sexual maturity." *American Journal of Anatomy* 31(5): 439-481.
- Bhartiya, D., K. Sriraman, S. Parte and H. Patel (2013). "Ovarian stem cells: absence of evidence is not evidence of absence." *J Ovarian Res* 6(1): 65.
- Bristol-Gould, S. K., P. K. Kreeger, C. G. Selkirk, S. M. Kilen, K. E. Mayo, L. D. Shea and T. K. Woodruff (2006). "Fate of the initial follicle pool: empirical and mathematical evidence supporting its sufficiency for adult fertility." *Developmental biology* 298(1): 149-154.
- Bui, H. T., N. Van Thuan, D. N. Kwon, Y. J. Choi, M. H. Kang, J. W. Han, T. Kim and J. H. Kim (2014). "Identification and characterization of putative stem cells in the adult pig ovary." *Development* 141(11): 2235-2244.
- Bukovsky, A., M. R. Caudle, M. Svetlikova and N. B. Upadhyaya (2004). "Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries." *Reprod Biol Endocrinol* 2: 20.
- Bukovsky, A., M. Svetlikova and M. R. Caudle (2005). "Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries." *Reprod Biol Endocrinol* 3: 17.
- Byskov, A., P. Høyer, C. Yding Andersen, S. Kristensen, A. Jespersen and K. Møllgård (2011). "No evidence for the presence of oogonia in the human ovary after their final clearance during the first two years of life." *Human Reproduction* 26(8): 2129-2139.
- Byskov, A. G., M. J. Faddy, J. G. Lemmen and C. Y. Andersen (2005). "Eggs forever?" *Differentiation* 73(9-10): 438-446.
- Ding, X., G. Liu, B. Xu, C. Wu, N. Hui, X. Ni, J. Wang, M. Du, X. Teng and J. Wu (2016). "Human GV oocytes generated by mitotically active germ cells obtained from follicular aspirates." *Sci Rep* 6: 28218.
- Esmailian, Y., B. G. Dedeoglu, A. Atalay and E. Erdemli (2012). "Investigation of stem cells in adult and prepubertal mouse ovaries." *Advances in Bioscience and Biotechnology* 3(07): 936.
- Faddy, M. and R. Gosden (2007). "Numbers of ovarian follicles and testing germ line renewal in the postnatal ovary: facts and fallacies." *Cell Cycle* 6(15): 1951-1952.
- Findlay, J. K., K. J. Hutt, M. Hickey and R. A. Anderson (2015). "How Is the Number of Primordial Follicles in the Ovarian Reserve Established?" *Biol Reprod* 93(5): 111.
- Gosden, R. G. (2013). "Oocyte development and loss." *Semin Reprod Med* 31(6): 393-398.

- Gosden, R. G., S. C. Laing, L. S. Felicio, J. F. Nelson and C. E. Finch (1983). "Imminent oocyte exhaustion and reduced follicular recruitment mark the transition to acyclicity in aging C57BL/6J mice." *Biol Reprod* 28(2): 255-260.
- Guo, K., C. H. Li, X. Y. Wang, D. J. He and P. Zheng (2016). "Germ stem cells are active in postnatal mouse ovary under physiological conditions." *Mol Hum Reprod* 22(5): 316-328.
- Hansen, K. R., N. S. Knowlton, A. C. Thyer, J. S. Charleston, M. R. Soules and N. A. Klein (2008). "A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause." *Hum Reprod* 23(3): 699-708.
- Hsueh, A. J., K. Kawamura, Y. Cheng and B. C. Fauser (2015). "Intraovarian control of early folliculogenesis." *Endocr Rev* 36(1): 1-24.
- Johnson, J., J. Bagley, M. Skaznik-Wikiel, H.-J. Lee, G. B. Adams, Y. Niikura, K. S. Tschudy, J. C. Tilly, M. L. Cortes and R. Forkert (2005). "Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood." *Cell* 122(2): 303-315.
- Johnson, J., J. Canning, T. Kaneko, J. K. Pru and J. L. Tilly (2004). "Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary." *Nature* 428(6979): 145-150.
- Kelsey, T. W., P. Wright, S. M. Nelson, R. A. Anderson and W. H. Wallace (2011). "A validated model of serum anti-mullerian hormone from conception to menopause." *PLoS One* 6(7): e22024.
- Kerr, J. B., L. Brogan, M. Myers, K. J. Hutt, T. Mladenovska, S. Ricardo, K. Hamza, C. L. Scott, A. Strasser and J. K. Findlay (2012). "The primordial follicle reserve is not renewed after chemical or γ -irradiation mediated depletion." *Reproduction* 143(4): 469-476.
- Kerr, J. B., R. Duckett, M. Myers, K. L. Britt, T. Mladenovska and J. K. Findlay (2006). "Quantification of healthy follicles in the neonatal and adult mouse ovary: evidence for maintenance of primordial follicle supply." *Reproduction* 132(1): 95-109.
- Kingery, H. (1917). "Oogenesis in the white mouse." *Journal of Morphology* 30(1): 261-315.
- Lei, L. and A. C. Spradling (2013). "Female mice lack adult germ-line stem cells but sustain oogenesis using stable primordial follicles." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(21): 8585-8590.
- Liu, Y., C. Wu, Q. Lyu, D. Yang, D. F. Albertini, D. L. Keefe and L. Liu (2007). "Germline stem cells and neo-oogenesis in the adult human ovary." *Developmental biology* 306(1): 112-120.

AULA JOVEN

Neo-ovogénesis y células madre germinales, ¿desafiando al dogma?

- Niikura, Y., T. Niikura and J. L. Tilly (2009). "Aged mouse ovaries possess rare premeiotic germ cells that can generate oocytes following transplantation into a young host environment." *Aging (Albany NY)* 1(12): 971-978.
- Notarianni, E. (2011). "Reinterpretation of evidence advanced for neo-oogenesis in mammals, in terms of a finite oocyte reserve." *J Ovarian Res* 4(1): 1.
- Nybo, A. A., J. Wohlfahrt, P. Christens, J. Olsen and M. Melbye (2000). "Is maternal age an independent risk factor for fetal loss?" *West J Med* 173(5): 331.
- Oatley, J. and P. A. Hunt (2012). "Of mice and (wo) men: purified oogonial stem cells from mouse and human ovaries." *Biology of Reproduction* 86(6): 196, 191-192.
- Pacchiarotti, J., C. Maki, T. Ramos, J. Marh, K. Howerton, J. Wong, J. Pham, S. Anorve, Y. C. Chow and F. Izadyar (2010). "Differentiation potential of germ line stem cells derived from the postnatal mouse ovary." *Differentiation* 79(3): 159-170.
- Parte, S., D. Bhartiya, D. D. Manjramkar, A. Chauhan and A. Joshi (2013). "Stimulation of ovarian stem cells by follicle stimulating hormone and basic fibroblast growth factor during cortical tissue culture." *J Ovarian Res* 6(1): 20.
- Parte, S., D. Bhartiya, J. Telang, V. Daithankar, V. Salvi, K. Zaveri and I. Hinduja (2011). "Detection, characterization, and spontaneous differentiation in vitro of very small embryonic-like putative stem cells in adult mammalian ovary." *Stem Cells Dev* 20(8): 1451-1464.
- Pearl, R. and W. F. Schoppe (1921). "Studies on the physiology of reproduction in the domestic fowl." *J Exp Zool* 34(1): 101-118.
- Peters, H., E. Levy and M. Crone (1962). "Deoxyribonucleic acid synthesis in oocytes of mouse embryos." *Nature* 195(4844): 915.
- Rao, C. N. (1927). "Memoirs: On the Structure of the Ovary and the Ovarian Ovum of *Loris lydekkerianus*, Cabr." *Journal of Cell Science* 2(281): 57-74.
- Richardson, S. J., V. Senikas and J. F. Nelson (1987). "Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion." *J Clin Endocrinol Metab* 65(6): 1231-1237.
- Silvestris, E., P. Cafforio, S. D'Oronzo, C. Felici, F. Silvestris and G. Loverro (2018). "In vitro differentiation of human oocyte-like cells from oogonial stem cells: single-cell isolation and molecular characterization." *Hum Reprod* 33(3): 464-473.

- Sriraman, K., D. Bhartiya, S. Anand and S. Bhutda (2015). "Mouse Ovarian Very Small Embryonic-Like Stem Cells Resist Chemotherapy and Retain Ability to Initiate Oocyte-Specific Differentiation." *Reprod Sci* 22(7): 884-903.
- Telfer, E. E. (2004). "Germline stem cells in the postnatal mammalian ovary: a phenomenon of prosimian primates and mice?" *Reprod Biol Endocrinol* 2: 24.
- Telfer, E. E. and R. A. Anderson (2019). "The existence and potential of germline stem cells in the adult mammalian ovary." *Climacteric* 22(1): 22-26.
- Tilly, J. L., Y. Niikura and B. R. Rueda (2009). "The current status of evidence for and against postnatal oogenesis in mammals: a case of ovarian optimism versus pessimism?" *Biol Reprod* 80(1): 2-12.
- Vanni, V. S., P. Viganò, E. Papaleo, G. Mangili, M. Candiani and V. Giorgione (2017). "Advances in improving fertility in women through stem cell-based clinical platforms." *Expert opinion on biological therapy* 17(5): 585-593.
- Veitia, R. A., E. Gluckman, M. Fellous and J. Soulier (2007). "Recovery of female fertility after chemotherapy, irradiation, and bone marrow allograft: further evidence against massive oocyte regeneration by bone marrow-derived germline stem cells." *Stem Cells* 25(5): 1334-1335.
- Virant-Klun, I., P. Rozman, B. Cvjeticanin, E. Vrtacnik-Bokal, S. Novakovic, T. Rulicke, P. Dovc and H. Meden-Vrtovec (2009). "Parthenogenetic embryo-like structures in the human ovarian surface epithelium cell culture in postmenopausal women with no naturally present follicles and oocytes." *Stem Cells Dev* 18(1): 137-149.
- Virant-Klun, I., N. Zech, P. Rozman, A. Vogler, B. Cvjeticanin, P. Klemenc, E. Malicev and H. Meden-Vrtovec (2008). "Putative stem cells with an embryonic character isolated from the ovarian surface epithelium of women with no naturally present follicles and oocytes." *Differentiation* 76(8): 843-856.
- Wagner, M., M. Yoshihara, I. Douagi, A. Damdimopoulos, S. Panula, S. Petropoulos, H. Lu, K. Pettersson, K. Palm and S. Katayama (2020). "Single-cell analysis of human ovarian cortex identifies distinct cell populations but no oogonial stem cells." *Nature communications* 11(1): 1-15.
- Wallace, W. H. and T. W. Kelsey (2010). "Human ovarian reserve from conception to the menopause." *PLoS One* 5(1): e8772.
- White, Y. A., D. C. Woods, Y. Takai, O. Ishihara, H. Seki and J. L. Tilly (2012). "Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women." *Nature medicine* 18(3): 413.

AULA JOVEN

Neo-ovogénesis y células madre germinales, ¿desafiando al dogma?

White, Y. A., D. C. Woods, Y. Takai, O. Ishihara, H. Seki and J. L. Tilly (2012). "Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women." *Nat Med* 18(3): 413-421.

Yuan, J., D. Zhang, L. Wang, M. Liu, J. Mao, Y. Yin, X. Ye, N. Liu, J. Han and Y. Gao (2013). "No evidence for neo-oogenesis may link to ovarian senescence in adult monkey." *Stem Cells* 31(11): 2538-2550.

Yuan, J., D. Zhang, L. Wang, M. Liu, J. Mao, Y. Yin, X. Ye, N. Liu, J. Han, Y. Gao, T. Cheng, D. L. Keefe and L. Liu (2013). "No evidence for neo-oogenesis may link to ovarian senescence in adult monkey." *Stem Cells* 31(11): 2538-2550.

Zhang, D., H. Fouad, W. D. Zoma, S. A. Salama, M. J. Wentz and A. Al-Hendy (2008). "Expression of stem and germ cell markers within nonfollicle structures in adult mouse ovary." *Reprod Sci* 15(2): 139-146.

Zhang, H., L. Liu, X. Li, K. Busayavalasa, Y. Shen, O. Hovatta, J.-Å. Gustafsson and K. Liu (2014). "Life-long in vivo cell-lineage tracing shows that no oogenesis originates from putative germline stem cells in adult mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(50): 17983-17988.

Zhang, H., S. Panula, S. Petropoulos, D. Edsgård, K. Busayavalasa, L. Liu, X. Li, S. Risal, Y. Shen and J. Shao (2015). "Adult human and mouse ovaries lack DDX4-expressing functional oogonial stem cells." *Nature medicine* 21(10): 1116.

Zhang, H., W. Zheng, Y. Shen, D. Adhikari, H. Ueno and K. Liu (2012). "Experimental evidence showing that no mitotically active female germline progenitors exist in postnatal mouse ovaries." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(31): 12580-12585.

Zhang, P., L. Lv and W. Xing (2010). "Early Meiotic-Specific Protein Expression in Post-natal Rat Ovaries." *Reproduction in domestic animals* 45(6): e447-e453.

Zou, K., Z. Yuan, Z. Yang, H. Luo, K. Sun, L. Zhou, J. Xiang, L. Shi, Q. Yu, Y. Zhang, R. Hou and J. Wu (2009). "Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries." *Nat Cell Biol* 11(5): 631-636.

Zuckerman, S. (1951). "The number of oocytes in the mature ovary." *Recent Progress in Hormone Research* 6: 63-109.

ASEBIR

Asociación para el Estudio
de la Biología de la Reproducción

¿Aún no disfrutas de las **ventajas ASEBIR?**

¡Hazte socio ahora y aprovéchalas!

- > Acceso a las becas Aula Joven y Bolsa de Viaje/estancia de formación
- > Asesoría jurídica gratuita
- > Seguro de Responsabilidad Civil bonificado
- > Precios especiales y acceso prioritario a la formación y el Control de Calidad ASEBIR
- > Posibilidad de formar parte de los Grupos de Interés
- > ¡Y mucho más!

Hazte socio ASEBIR por solo 50€/año*

*Descuentos especiales para menores de 30 años, estudiantes de doctorado o master o en situación de desempleo.

www.asebir.com / registrarse



INNOVACIÓN MERCK/ASEBIR

EVOLUCIÓN DEL ESTUDIO DE LA COMUNICACIÓN ORAL 008 PRESENTADA EN EL
XI CONGRESO ASEBIR Y GANADORA DEL PREMIO A LA INNOVACIÓN MERCK ASEBIR 2019

APLICACIÓN DE LA INTELIGENCIA ARTIFICIAL PARA LA SELECCIÓN EMBRIONARIA COMBINANDO EL ANÁLISIS PROTEICO DEL MEDIO DE CULTIVO EN CONTACTO CON EL BLASTOCISTO, LA MORFOCINÉTICA Y LA MORFOLOGÍA EN D5 DE DESARROLLO

APPLICATION OF ARTIFICIAL INTELLIGENCE FOR EMBRYO SELECTION COMBINING PROTEIN ANALYSIS OF SPENT CULTURE MEDIA, MORPHOKINETICS AND MORPHOLOGY ON DAY 5 OF DEVELOPMENT

Celia Fideli. IVIRMA Global Valencia, **Lorena Bori.** IVIRMA Global Valencia. IVI Foundation, Valencia, **Marco Toschi.** IVIRMA Global Roma, **Lucía Alegre.** IVIRMA Global Valencia, **José Celso Rocha.** Universidade Estadual Paulista (Unesp), Brazil, **Marcos Meseguer.** IVIRMA Global Valencia. IVI Foundation, Valencia.

► RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue desarrollar un modelo de inteligencia artificial basado en redes neuronales artificiales o ANN (del inglés *Artificial Neural Network*) para predecir la probabilidad de conseguir un recién nacido vivo utilizando el perfil proteómico del medio de cultivo en el que se ha desarrollado el embrión y la morfología del blastocisto. En este estudio de cohorte retrospectivo se estudió una única imagen de 186 embriones y se analizó el perfil proteico de 81 muestras de medio de cultivo embrionario de pacientes incluidas en el programa de diagnóstico genético preimplantacional de aneuploidías o PGT-A, del inglés *Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy*. Tres arquitecturas de la ANN clasificaron correctamente la mayoría de los embriones como aquellos que darían lugar a un recién nacido vivo (RNV+) y los que no (RNV-). Los resultados muestran que el modelo propuesto en este estudio preliminar puede proporcionar una herramienta prometedora para seleccionar el embrión con mayor probabilidad de dar lugar a un recién nacido vivo en una cohorte de embriones euploides. La precisión de la predicción demostrada por este *software* puede mejorar la eficacia de un tratamiento de reproducción asistida al reducir el número de transferencias por paciente. No obstante, son necesarios estudios prospectivos.

PALABRAS CLAVE: Inteligencia artificial, red neuronal artificial, morfología embrionaria, recién nacido vivo, proteómica

► ABSTRACT

The study aimed to develop an artificial intelligence model based on artificial neural networks (ANNs) to predict the likelihood of achieving a live birth using the proteomic profile of spent culture media and blastocyst morphology. In this retrospective cohort study a single image of 186 embryos was studied, and the protein profile was analysed in 81 samples of spent embryo culture medium from patients included in the PGT-A programme. Three ANN architectures classified most of the embryos correctly as leading (LB+) or not leading (LB-) to a live birth. The results show that the model proposed in this preliminary report may provide a promising tool to select the embryo most likely to lead to a live birth in a euploid cohort. The accuracy of prediction demonstrated by this software may improve the efficacy of an assisted reproduction treatment by reducing the number of transfers per patient. Prospective studies are, however, needed.

KEY WORDS: Artificial intelligence, artificial neural network, blastocyst morphology, live birth, proteomics

INNOVACIÓN MERCK/ASEBIR

Aplicación de la inteligencia artificial para la selección embrionaria combinando el análisis proteico del medio de cultivo en contacto con el blastocisto, la morfocinética y la morfología en D5 de desarrollo.

1. INTRODUCCIÓN

Los dos principales factores de los que depende el éxito de un tratamiento de fecundación *in vitro* (FIV) son el embrión y el endometrio (Edwards et al., 1984). Para evaluar la viabilidad del embrión y mejorar los resultados clínicos han surgido nuevos métodos no invasivos basados en las ciencias "ómicas", como la proteómica y la metabolómica (Krisner et al., 2015). Existen pruebas de la importancia de determinados ligandos solubles y receptores tanto en el embrión como en el tracto reproductivo femenino durante la etapa preimplantacional (Thouas et al., 2015). El conjunto de proteínas secretadas o metabolizadas por el embrión se conoce como secretoma (Hathout, 2007), por lo que, mediante el análisis del medio de cultivo, se podría obtener una prometedora fuente de información acerca de las proteínas y del estado metabólico del embrión (Hollywood et al., 2006).

El análisis del medio de cultivo refleja el consumo y la secreción de varias proteínas por parte del embrión. Además, se han observado diferentes patrones de proteínas según el potencial de implantación y la calidad del embrión (Dominguez et al., 2010; Robertson, 2007).

Por otro lado, la inteligencia artificial está avanzando en el campo de la embriología humana en cuanto a la capacidad de procesamiento para aprender y desarrollar un comportamiento inteligente (Simopoulou et al., 2018). Las publicaciones se han multiplicado por siete en un año (Curchoe y Bormann, 2019), lo que indica la gran capacidad que tiene el uso de la inteligencia artificial para mejorar la eficiencia de los tratamientos de reproducción asistida.

Recientemente, se ha demostrado que la inteligencia artificial es una herramienta no invasiva con un elevado potencial para predecir los recién nacidos vivos gracias a su capacidad para reconocer patrones del desarrollo embrionario (Miyagi, 2019; Qiu et al., 2019). Entre las técnicas de inteligencia artificial, destacan las siguientes: el aprendizaje profundo, que requiere de extensas bases de datos (Chen et al., 2019; Miyagi, 2019) y de grandes esfuerzos computacionales (Najafabadi et al., 2015); las redes neuronales convolucionales, que son un subconjunto del aprendizaje profundo ampliamente utilizado en el análisis de imágenes (Matusevičius et al., 2017); el perceptrón multicapa, cuya arquitectura de red neuronal artificial (ANN) contiene capas intermedias entre los datos de entrada y salida (Abiodun et al., 2018; Milewski et al., 2017; Zador, 2019); y las redes Bayesianas, que son modelos probabilísticos (Hernández-González et al., 2018; Uyar et al., 2015). Todas estas técnicas utilizan redes neuronales artificiales como base del modelo.

Las ANNs son técnicas computacionales inspiradas en el funcionamiento del cerebro humano cuyo objetivo principal es aprender tareas que buscan resolver problemas complejos (Vanneschi y Castelli, 2018). La caracterización de una ANN se logra gracias a su autoaprendizaje a través del entrenamiento. Un algoritmo comúnmente utilizado para el aprendizaje supervisado es la retropropagación (Gupta y Sexton, 1999).

La introducción de la inteligencia artificial en los laboratorios de FIV permitiría analizar las imágenes de los embriones sin necesidad de realizar previamente anotaciones manuales. Así pues, la introducción de sistemas de visión por ordenador capaces de extraer información objetiva y estandarizada de las imágenes (Danuser, 2011) y de llevar a cabo anotaciones automáticas podría reducir la subjetividad en la selección de los embriones (Manna et al., 2013). Las características macroscópicas, como el número de células, la textura o los patrones de movimiento, podrían aprenderse mediante datos de entrenamiento.

Ya se ha demostrado que los métodos para automatizar completamente la evaluación de los embriones de diferentes mamíferos funcionan (Rocha et al., 2017), y el siguiente paso sería transferir este conocimiento a la embriología humana (Blank et al., 2019). Recientemente, se han publicado varios enfoques que utilizan técnicas de inteligencia artificial para la clasificación de embriones y la predicción de resultados clínicos (véase, por ejemplo, Bormann et al., 2020; Chavez-Badiola et al., 2020; Dirvanauskas et al., 2019; Khosravi et al., 2019; Rad et al., 2018; Rocha et al., 2018; Tran et al., 2019; Zaninovic et al., 2018).

El objetivo del estudio fue desarrollar un modelo combinado basado en la inteligencia artificial utilizando datos morfológicos de varios embriones para crear una ANN capaz de predecir los recién nacidos vivos. Además, utilizando la información de las imágenes de los blastocistos y la información proteómica tratamos de predecir el potencial de un embrión euploide para dar lugar a un recién nacido vivo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO Y POBLACIÓN

Se trata de estudio unicéntrico con dos poblaciones: 131 receptoras pertenecientes al programa de ovodonación de IVI Valencia sin PGT y 81 mujeres que utilizaron ovocitos propios con PGT para la detección de aneuploidias (PGT-A).

Se analizó una única imagen *time-lapse* de cada embrión a las 111.5 ± 1.5 h de desarrollo. Además, se recogieron 20 μ l del medio de cultivo de los embriones biopsiados para el análisis

INNOVACIÓN MERCK/ASEBIR

Aplicación de la inteligencia artificial para la selección embrionaria combinando el análisis proteico del medio de cultivo en contacto con el blastocisto, la morfocinética y la morfología en D5 de desarrollo.

proteómico y ocho muestras control (medio de cultivo sin embriones cultivados). Únicamente se analizaron los medios de cultivo pertenecientes a embriones euploides utilizados en transferencias de un solo embrión.

Para la aplicación de la técnica de inteligencia artificial se seleccionaron 212 embriones en total: el primer grupo estaba formado por 131 embriones obtenidos del programa de ovodonación, y el segundo grupo por 81 embriones procedentes de tratamientos con ovocitos propios de los cuales se había obtenido información proteómica. Después del análisis de imagen se excluyeron 26 embriones del segundo grupo: 19 blastocistos se encontraban fuera de la zona pelúcida a las 111 ± 1.5 h de desarrollo y siete embriones no alcanzaron el estadio de blastocisto en el momento propuesto.

OBTENCIÓN DE LOS OVOCITOS Y CULTIVO EMBRIONARIO

Tras la aspiración folicular, los ovocitos se mantuvieron en el medio de cultivo con un 5% de CO₂ y un 5% de O₂ a 37°C y fueron decumulados pre-ICSI pasadas 4 horas de la punción. Una vez realizado la ICSI, los embriones se cultivaron individualmente hasta el quinto o sexto día de desarrollo con el sistema *time-lapse* de EmbryoScope (Vitrolife, Dinamarca). La fecundación fue observada a las 16-19 h post ICSI.

Los blastocistos se clasificaron el día 5 (120 h post ICSI) basándose en los criterios de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) y en el KIDScore D5 (con el *software* EmbryoViewer; Vitrolife, Dinamarca). Si había más de un embrión con misma calidad morfológica, la puntuación proporcionada por el KIDScore D5 decidía cuál era el transferido.

PGT-A

Se llevó a cabo una pequeña incisión atravesando la zona pelúcida (eclosión asistida) a los embriones en día 3 de desarrollo, facilitando la biopsia del trofotodermo el día 5 de cultivo. El análisis cromosómico se realizó mediante la tecnología de secuenciación de nueva generación (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.).

TRANSFERENCIA EMBRIONARIA Y RESULTADOS CLÍNICOS

Se realizó una transferencia de un único embrión para todas las pacientes; para las del programa de PGT-A, el blastocisto se había vitrificado y desvitrificado previamente con el método Cryotop (Kitazato Biopharma, Japón). Se seleccionaron los embriones para la transferencia basándose en el estado cromosómico, la morfología y la morfocinética. La concentración de β -HCG se determinó a los 10 días de la transferencia,

y el embarazo clínico se confirmó por la presencia de saco gestacional en la quinta semana de embarazo. Por último, las pacientes informaron del recién nacido vivo tras el parto.

ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS DEL MEDIO DE CULTIVO

Se analizaron las concentraciones relativas de 92 proteínas de 81 muestras de medio de cultivo donde se habían desarrollado los embriones y de ocho muestras control utilizando el análisis de extensión de proximidad (PEA) Proseek Multiplex (Olink Bioscience, Suecia).

Las proteínas se midieron con el panel Olink Inflammation (Olink Proteomics, Suecia) según las instrucciones del fabricante. La lectura final del ensayo se presenta como valores de Expresión Proteica Normalizada (NPX), que son unidades arbitrarias en una escala log₂, en la que un valor alto corresponde a una mayor expresión proteica. Por lo tanto, una diferencia de 1 NPX significa una duplicación en la concentración de las proteínas.

MODELO DE INTELIGENCIA ARTIFICIAL: ANÁLISIS DE IMÁGENES, ANÁLISIS DE COLINEALIDAD, ANN Y ALGORITMOS GENÉTICOS

Para la estandarización de las 186 imágenes de los blastocistos antes de la aplicación de la técnica de inteligencia artificial se utilizó la metodología descrita por Rocha y sus colegas (Rocha et al., 2017). El algoritmo obtuvo 33 variables matemáticas utilizando la medición del área, el número de píxeles presentes en cada porción segmentada de la imagen del blastocisto, los patrones binarios (Huang et al., 2011) y el análisis de textura (Bino et al., 2012). Estas variables se eligieron buscando representar todas las características relevantes del blastocisto para la evaluación de la calidad del embrión y la predicción de recién nacidos vivos a través de la inteligencia artificial.

Se utilizó un análisis de colinealidad para comprobar si las variables estaban correlacionadas entre sí en función del factor de inflación de la varianza (VIF). La eliminación de las variables colineales redujo el número de variables que representaban al embrión humano a 20.

Asimismo, se realizó un análisis de colinealidad para discriminar las proteínas independientes y no redundantes. Como se describe en detalle en "Análisis de colinealidad de las proteínas", más adelante, siete de las proteínas fueron adecuadas para utilizarlas como entrada para la ANN, junto con las 20 variables morfológicas.

El conjunto de datos de los 131 embriones se dividió aleatoriamente en un 70% para el entrenamiento, un 15% para la validación y un 15% para la prueba de la ANN. Del conjunto de datos de 55 embriones, el 20% se utilizó para el test a ciegas,

INNOVACIÓN MERCK/ASEBIR

Aplicación de la inteligencia artificial para la selección embrionaria combinando el análisis proteico del medio de cultivo en contacto con el blastocisto, la morfocinética y la morfología en D5 de desarrollo.

y los 44 embriones restantes se dividieron aleatoriamente en un 68% para el entrenamiento, un 16% para la validación y un 16% para la prueba de la ANN (Kalpana et al., 2015).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron pruebas estadísticas para comprobar las diferencias significativas en los valores de cada proteína en los medios de cultivo de los embriones en comparación con los medios control y en los medios de los embriones que implantaron en comparación con los que no implantaron. Se utilizó el Test-T para los parámetros con una distribución normal, y una prueba de suma de rangos de Wilcoxon para aquellos que no siguieron una distribución normal, considerando la presencia de significación estadística cuando el valor de $P < 0.05$.

El análisis de las imágenes y el modelo final se evaluaron mediante dos técnicas. En primer lugar, se utilizaron curvas de la característica operativa del receptor (ROC) para analizar los resultados de la inteligencia artificial en el reconocimiento de patrones. En segundo lugar, se utilizó la metodología de la matriz de confusión para analizar la intersección entre los datos proporcionados por el modelo (el sistema de inteligencia artificial) y los resultados reales.

3. RESULTADOS

La edad media de las pacientes incluidas en el estudio que realizaron el tratamiento con ovocitos propios fue de 41,6 años, con un índice de masa corporal (IMC) medio de 23,2 kg/m³. En cuanto al resultado clínico, este grupo mostró una β -HCG positiva del 63,0%, una tasa de implantación del 56,8% y una tasa de recién nacidos vivos del 47,0%. Las pacientes incluidas en el programa de donación de ovocitos tenían una edad media de 37,9 años con un IMC medio de 22,9 kg/m³ y sus tratamientos lograron una tasa de gestación positiva del 68,7%, una tasa de implantación del 54,20% y una tasa de recién nacidos vivos del 40,5%.

PERFIL PROTEÓMICO DE LOS EMBRIONES PREIMPLANTACIONALES.

De un total de 92 proteínas, 67 tenían valores NPX idénticos en todas las muestras analizadas y solo 25 proteínas tenían valores NPX diferentes, aquellas mostradas en la Tabla I. Se detectaron concentraciones más altas de tres proteínas en los medios de cultivo donde se habían cultivado embriones en comparación con los medios control. Estas proteínas fueron la IL-8 ($P = 0,025$), la IL-6 ($P = 0,001$) y el uPA (activador del plasminógeno tipo uroquinasa; $P = 0,006$). Además, se detectaron concentraciones más bajas de 14 proteínas en los medios de cultivo de los embriones en comparación con las concentraciones del grupo control. Estas proteínas eran DNER (receptor

relacionado con el EGF tipo Delta/Notch; $P < 0,001$), CSF-1 (factor estimulante de colonias de macrófagos 1; $P < 0,001$), Flt3L (ligando de la tirosina quinasa 3 tipo FMS; $P < 0,001$), SCF ($P < 0,001$), CD40 ($P < 0,001$), MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos; $P < 0,001$), CX3CL1 ($P < 0,001$), CD6 ($P < 0,001$), TRAIL ($P = 0,002$), TNFRSF9 (miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral 9; $P < 0,001$), CD244 ($P < 0,001$), IL-18 ($P < 0,001$), CCL23 ($P < 0,001$) y IL-18R1 ($P < 0,001$).

La única proteína con un valor NPX diferente en los embriones que implantaron (valor NPX 2,44) y los que no implantaron (valor NPX 2,76) fue VEGFA ($P = 0,017$).

ANÁLISIS DE COLINEALIDAD DE LAS PROTEÍNAS

El análisis de colinealidad de las 25 proteínas demostró que la mayoría de ellas estaban muy correlacionadas entre sí. Así pues, tras corregir la colinealidad, quedaron siete proteínas independientes y no redundantes para su uso en la ANN: metaloproteína de matriz-1 (MMP-1), IL-6, VEGFA, uPA, citoquina inducida por activación relacionada con el TNF (TRANCE), Flt3L y DNER. Los valores de NPX para estas proteínas aparecen en la Figura 1.

MODELO DE INTELIGENCIA ARTIFICIAL

Para el diseño de la ANN a partir de los datos morfológicos fue necesario extraer las variables relevantes de las 131 imágenes de los blastocistos incluidas en la primera población. El entrenamiento realizado con el 70% de las imágenes fue capaz de clasificar correctamente el 89% de los embriones como RNV+ o RNV- (verdadero positivo, 33; verdadero negativo, 48; falso positivo, 6; falso negativo, 4), y un 95% de clasificación correcta en el test (verdadero positivo, 6; verdadero negativo, 13; falso positivo, 1; falso negativo, 0).

En cuanto a la validación del modelo con la segunda población de embriones y considerando los datos de proteómica, las tres arquitecturas de ANN más eficientes se muestran en la Tabla II con sus respectivas AUCs. Además, las respectivas matrices de confusión para el conjunto de embriones incluidos en la fase de test se pueden observar en la Figura 2. La arquitectura de red desarrollada utilizando IL-6 y MMP-1 logró clasificar correctamente todos los embriones como RNV+ o RNV- en las fases de entrenamiento, validación y test (éxito total del 100%). El AUC resultante para predecir el RNV+ y RNV- alcanzó el valor más alto, 1,0.

El test a ciegas de la arquitectura de red 1 se llevó a cabo con 11 embriones que no habían sido utilizados previamente, y alcanzó una precisión de predicción del 72,7%. Clasificó correctamente ocho embriones del total (4 verdaderos positivos, 4 verdaderos negativos, 1 falso positivo y 2 falsos negativos).

INNOVACIÓN MERCK/ASEBIR

Aplicación de la inteligencia artificial para la selección embrionaria combinando el análisis proteico del medio de cultivo en contacto con el blastocisto, la morfocinética y la morfología en D5 de desarrollo.

4. DISCUSIÓN

La información morfológica de las imágenes de los blastocistos y los valores de proteómica obtenidos del análisis del secretoma embrionario fueron utilizados para predecir el potencial de un embrión euploide para dar lugar a un recién nacido vivo.

El análisis proteómico de los medios de cultivo mostró que, de las 92 proteínas medidas, solo IL-6, uPA y IL-8 fueron secretadas de forma diferencial por los embriones en desarrollo. Estudios anteriores revelaron que la concentración de IL-6 en el medio de cultivo podría ser útil para seleccionar el embrión capaz de implantar (Domínguez et al., 2015). Otro grupo de investigación demostró que la IL-6 se encuentra en concentraciones mayores en los embriones que alcanzan el estadio de blastocisto en comparación con aquellos que se detienen en su desarrollo (Lindgren et al., 2018). Las otras proteínas encontradas en el presente estudio que son secretadas diferencialmente también han sido detectadas previamente. Mientras que la primera evidencia de uPA en los medios de cultivo de embriones fue en 1996 (Khamisi et al., 1996), la presencia de IL-8 no se identificó en el secretoma del embrión hasta 2018 (Lindgren et al., 2018), utilizando la tecnología PEA.

Al finalizar el análisis de colinealidad, quedaron siete proteínas para utilizarlas en el modelo de inteligencia artificial. Según los resultados, dos de estas proteínas (IL-6 y uPA) eran secretadas por los embriones, otras dos (DNER y Flt3L) eran las que se consumían, y una proteína (VEGFA) estaba relacionada con una mala implantación. En cuanto a las otras dos proteínas, los autores consideran que han superado el análisis de colinealidad debido a sus características exclusivas: MMP-1 fue la única con un valor medio negativo tanto en el medio control como en el de los embriones; y TRANCE no se encontró en los medios control, pero estuvo presente en todos los medios que habían contenido un embrión desarrollándose. Además, TRANCE fue la única de las siete proteínas con una diferencia significativa en la concentración relativa entre las muestras RNV+ y RNV-.

El análisis de imagen que se ha llevado a cabo sobre las imágenes de los blastocistos ha sido probado en un estudio anterior que mostró buenos resultados en la clasificación de la calidad de los blastocistos bovinos (Rocha et al., 2017). Este *software* consideró que 20 variables morfológicas de embriones humanos eran suficientes para predecir la probabilidad de lograr un recién nacido vivo. Estos parámetros se combinaron con los datos del análisis proteómico para desarrollar el modelo de inteligencia artificial de predicción.

Los resultados actuales demostraron que la precisión de la predicción era mayor a medida que mejoraba la arquitectura

de la ANN. En primer lugar, el modelo creado que utilizó 25 proteínas clasificó correctamente el 83,3% de los embriones utilizados en el test. En segundo lugar, el análisis de colinealidad demostró ser eficaz, ya que el poder de predicción mejoró hasta el 85,7% cuando sólo se utilizaron las siete proteínas independientes resultantes. Por último, el modelo de inteligencia artificial alcanzó la mayor precisión en la predicción de recién nacidos vivos (AUC = 1) cuando se consideraron IL-6, MMP-1 y las 20 variables morfológicas. Se conoce que estas proteínas desempeñan un papel importante en la función reproductora. IL-6 es relevante para el desarrollo embrionario (Domínguez et al., 2010, 2015; Iles, 2019), y MMP-1 se ha detectado en los ovarios de mamíferos (Hulbooy, 1997) y en líquido folicular humano (Lee et al., 2005).

Una publicación reciente demostró que, para la selección de los embriones, es mejor un algoritmo objetivo de imágenes *time-lapse* en comparación al sistema de clasificación morfológica subjetiva de los blastocistos (Fishel et al., 2019). El algoritmo utilizado había sido publicado previamente (Fishel et al., 2017) y obtuvo un AUC del 67,43% para la predicción de recién nacidos vivos, a diferencia del 61,74% obtenido utilizando la clasificación morfológica de los blastocistos. La precisión en la selección de los embriones utilizando el modelo propuesto actual es mayor que utilizando únicamente la selección morfológica estándar o los algoritmos desarrollados con imágenes *time-lapse*.

La primera aplicación de una ANN para predecir el resultado de un tratamiento de FIV alcanzó una precisión del 59% (Kaufmann et al., 1997). Desde entonces, se han desarrollado varios modelos de predicción basados en diferentes poblaciones de pacientes, como en ciclos asociados a infertilidad por factor masculino (Wald, 2005) o en mujeres con endometriosis (Ballster et al., 2012). Además, los parámetros morfocinéticos de los embriones se utilizaron exclusivamente como datos de entrada para una ANN que predijo el 70% de los embarazos (Milewski et al., 2017).

Actualmente, las imágenes de los embriones facilitadas por los sistemas *time-lapse* se han convertido en objeto de estudios basados en inteligencia artificial. Se han utilizado técnicas de aprendizaje profundo para predecir la calidad de los blastocistos y seleccionar el embrión más adecuado para la transferencia (Khosravi et al., 2019). Los embriones clasificados como de buena calidad por la red neuronal profunda de estos autores, denominada STORK, mostraron mayores probabilidades de dar lugar a un recién nacido vivo que los clasificados como de mala calidad (61,4% y 50,9%, respectivamente). Sin embargo, STORK no es capaz de estimar la tasa de embarazo, aunque obtuvo un AUC muy elevado (0,98) en la predicción de la calidad de los blastocistos. Recientemente, Tran y sus

INNOVACIÓN MERCK/ASEBIR

Aplicación de la inteligencia artificial para la selección embrionaria combinando el análisis proteico del medio de cultivo en contacto con el blastocisto, la morfocinética y la morfología en D5 de desarrollo.

colaboradores (Tran et al., 2019) han desarrollado otro modelo de aprendizaje profundo que utilizó el vídeo completo del desarrollo de los embriones para predecir la probabilidad de embarazo, con un AUC de 0,93 en una validación cruzada estratificada de 5 veces.

Las limitaciones de este estudio que deben considerarse se reflejan en el diseño de la investigación. El modelo se entrenó con datos proteómicos y variables morfológicas procedentes del análisis de imágenes de un sistema *time-lapse*. La población total de embriones se distribuyó en dos grupos con fases diferentes (entrenamiento, validación y test), lo que dio lugar a un número reducido de embriones en cada uno. Además, en este estudio sólo participaron un laboratorio y un único medio de cultivo. Esto podría considerarse una ventaja en el análisis proteómico, pero la aplicabilidad a otros laboratorios sigue sin estar clara. Además, existen evidencias de variabilidad de proteínas y pH entre lotes con el mismo medio (Dyrlund et al., 2014; Leonard et al., 2013; Tarahomi et al., 2018). En general, los modelos desarrollados con ANN también podrían verse afectados por el fenómeno del sobreajuste. En este estudio se trató de evitarlo mediante la definición de las variables de entrada y salida. El éxito global en el test a ciegas podría considerarse como prueba (72,7% para el test a ciegas frente al 100% para el entrenamiento, la validación y el test). También es necesario destacar que el modelo con ovocitos propios se construyó utilizando solo embriones euploides, por lo que el valor clínico reside en distinguir el embrión más viable entre los que se sabe que son euploides. Los estudios posteriores deberían tener un gran tamaño muestral y un carácter multicéntrico, y deberían incluir datos de diferentes sistemas *time-lapse* para estandarizar el modelo de inteligencia artificial y globalizar su uso.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los embriólogos y técnicos del laboratorio del laboratorio de FIV de IVI-RMA Global Valencia por su apoyo clínico. Los autores también agradecen la contribución de la Fundación IVI Fundación IVI y la Universidad Estatal de São Paulo en este proyecto. Este trabajo fue apoyado por el Ministerio de Ciencia y Universidades CDTI (IDI-20191102) concedido a M.M.; las becas # 2017/19323-5, 2018/19371-2 y 2018/24252-2 de la Fundación de Apoyo a la Investigación Científica del Estado de São Paulo (FAPESP); y del Ministerio de Economía y Competitividad de España a través del programa Miguel Servet [CPII018/00002] concedido a F.D.

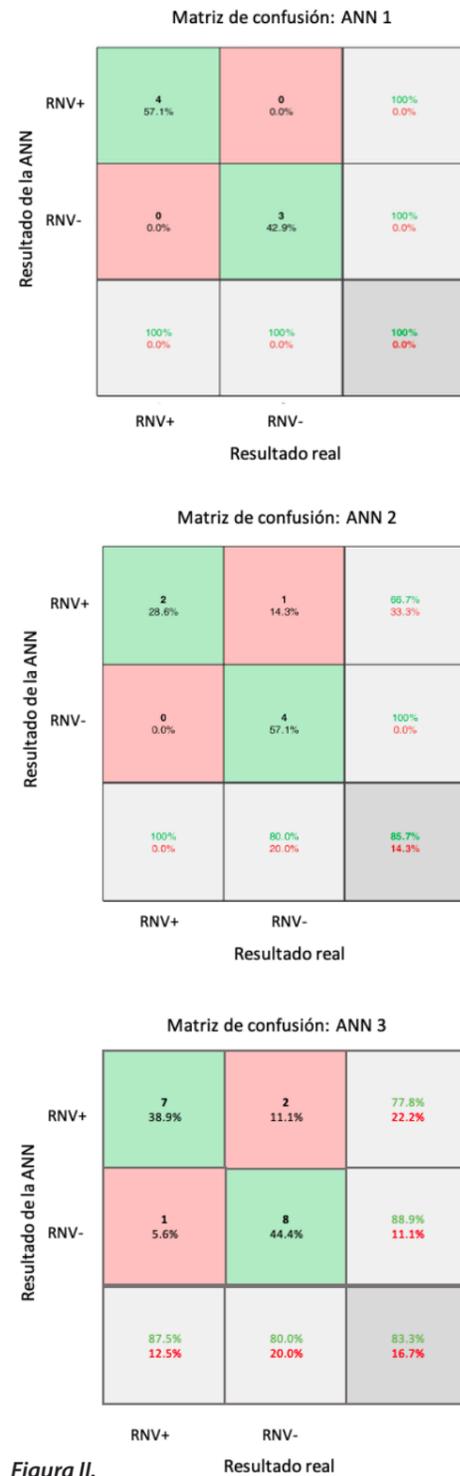


Figura II.

INNOVACIÓN MERCK/ASEBIR

Aplicación de la inteligencia artificial para la selección embrionaria combinando el análisis proteico del medio de cultivo en contacto con el blastocisto, la morfocinética y la morfología en D5 de desarrollo.

6. TABLAS Y FIGURAS

PROTEÍNA	VALOR NPX		CD6	1,4377813	0,7541528
	Medio de cultivo control	Medio de cultivo embrionario			
IL8	0,25634	2,2991595	SCF	3,5661163	2,721411
VEGFA	2,7445225	2,6119615	IL18	0,8207	0,3872041
CD244	1,0748025	0,5634183	FGF-23	0,1601113	0,1326154
OPG	1,2891788	1,100126	MMP-1	-0,6737013	-0,4724993
uPA	0,19311	0,7115716	IL-18R1	2,0364475	1,3599802
IL6	0	0,9725556	TRANCE	0	0,2303732
MCP-1	4,3756963	3,6325751	CCL23	0,668465	0,3057357
TRAIL	0,955765	0,3826641	Flt3L	6,8354325	5,9207411
CST5	1,5911625	1,4773527	DNER	5,568445	4,6026246
IL-1 α	0,24942	0,3073758	CD40	5,9177125	5,1142846
CXCL1	0,73557	1,2175985	CX3CL1	0,8723038	0,1696921
			TNFRSF9	1,2628213	0,7224489
			CSF-1	6,3439188	5,4234956

Tabla I.

ARQUITECTURA DE ANN	DATOS DE ENTRADA		TEST	
	Morfología del análisis de imagen	Datos de proteómica	RNV+	RNV-
1	20 variables	MMP-1, IL-6	AUC=1	AUC=1
2	20 variables	MMP-1, IL-6, VEGFA, uPA, TRANCE, Flt3L and DNER	AUC=0.9	AUC=0.9
3	20 variables	25 proteínas	AUC=0.83	AUC=0.84

Tabla II.

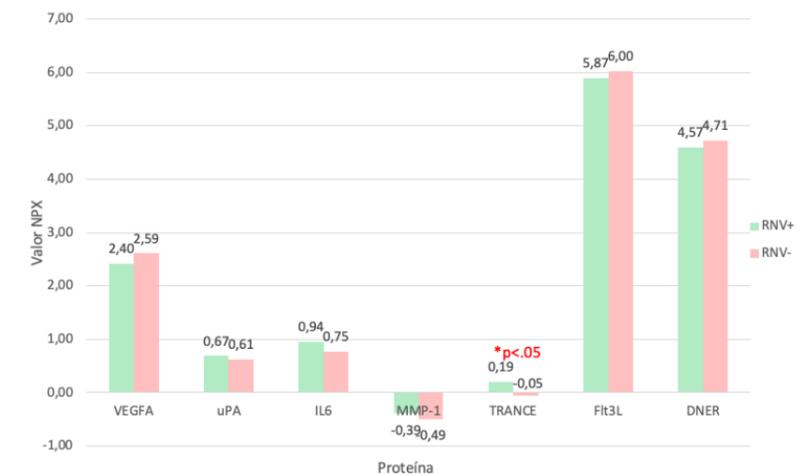


Figura I.

INNOVACIÓN MERCK/ASEBIR

Aplicación de la inteligencia artificial para la selección embrionaria combinando el análisis proteico del medio de cultivo en contacto con el blastocisto, la morfocinética y la morfología en D5 de desarrollo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abiodun O, Jantan A, Omolara A, Dada K, Mohamed N, Arshad H. State-of-the-art in artificial neural network applications: A survey. *Heliyon* 2018; 4:e00938
2. Ballester M, Oppenheimer A, Mathieu E, Touboul C, Antoine J, Coutant C, et al. Nomogram to predict pregnancy rate after ICSI – IVF cycle in patients with endometriosis. *Hum. Reprod.* 2012; 27:451–456
3. Bino VS, Unnikrishnan A, Balakrishnan K. Gray Level Co - Occurrence Matrices: Generalisation and some new features. *Int. J. Comput. Sci. Eng. Inf. Technol.* 2012; 2:151–157
4. Blank C, Wildeboer R, Decroo I, Tilleman K, Weyers B, Sutter P, et al. Prediction of implantation after blastocyst transfer in in vitro fertilization: a machinelearning perspective. *Fertil. Steril.* 2019; 111:318–326
5. Bormann C, Thirumalaraju P, Kanakasabapathy M, Kandula H, Souter I, Dimitriadis I, et al. Consistency and objectivity of automated embryo assessments using deep neural networks. *Fertil. Sterility Sci. Congr. Suppl. Oral Poster Sess. Abstr.* 2020; 113:781–787
6. Chavez-Badiola A, Flores-Sai A, Mendizabal-Ruiz G. Predicting pregnancy test results after embryo transfer by image feature extraction and analysis using machine learning. *Sci. Rep.* 2020; 10:4394
7. Chen T, Zheng W, Liu C, Huang I, Lai H, Liu M. Using Deep Learning with Large Dataset of Microscope Images to Develop an Automated Embryo Grading System. *Fertil. Reprod.* 2019; 1:51–56
8. Curchoe CL, Bormann CL. Artificial intelligence and machine learning for human reproduction and embryology presented at ASRM and ESHRE 2018. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2019; 36:591–600
9. Danuser G. Essay Computer Vision in Cell Biology. *Cell* 2011; 147:973–978
10. Dirvanauskas D, Maskeliunas R, Raudonis V, Damasevicius R. Embryo development stage prediction algorithm for automated time lapse incubators. *Comput. Methods Programs Biomed.* 2019; 177:161–174
11. Dominguez F, Gadea B, Mercader A, Esteban F, Pellicer A, Simón C. Embryologic outcome and secretome profile of implanted blastocysts obtained after coculture in human endometrial epithelial cells versus the sequential system. *Fertil. Steril.* 2010; 93:774–782e1
12. Dyrland TF, Kirkegaard K, Poulsen ET, Sanggaard KW, Hindkjær JJ, Kjems J, et al. Unconditioned commercial embryo culture media contain a large variety of non-declared proteins: a comprehensive proteomics analysis. *Hum. Reprod.* 2014; 29:2421–2430
13. Edwards RG, Fishel SB, Cohen J, Fehilly CB, Purdy JM, Slater JM, et al. Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J. Vitro. Fertil. Embryo. Transf.* 1984; 1:3–23
14. Fishel S, Campbell A, Foad F, Davies L, Best L, Davis N, et al. Evolution of Embryo Selection for IVF from Subjective Morphology Assessment to Objective Time-Lapse Algorithms Improves Chance of Live Birth. *Reprod. Biomed. Online* 2019; 40:61–70
15. Fishel S, Campbell A, Montgomery S, Smith R, Nice L, Duffy S, et al. Live births after embryo selection using morphokinetics versus conventional morphology: a retrospective analysis. *Reprod. Biomed. Online* 2017; 35:407–416
16. Gupta JND, Sexton RS. Comparing backpropagation with a genetic algorithm for neural network training. *Omega* 1999; 27:679–684
17. Hathout Y. Approaches to the study of the cell secretome. *Expert Rev. Proteomics* 2007; 4: 239–248
18. Hernández-González J, Inza I, Crisol-Ortiz L, Guembe MA, Iñarra MJ, Lozano JA. Fitting the data from embryo implantation prediction: Learning from label proportions. *Stat Methods Med. Res.* 2018; 27:1056–1066
19. Hollywood K, Brison DR, Goodacre R. Metabolomics: Current technologies and future trends. *Proteomics* 2006; 6:4716–4723
20. Huang D, Shan C, Ardabilian M, Wang Y, Liming C. Local Binary Patterns and Its Application to Facial Image Analysis: A Survey. *EEE Trans Syst. Man., Cybern* 2011; 4:1–17
21. Hulbooy D. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol. Hum. Reprod.* 1997; 3:27–45
22. Iles RK. Secretome profile selection of optimal IVF embryos by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2019; 36:1153–1160
23. Kalpana R, Chitra M, Vijayakalashmi K. Pattern classification of EEG signals on different states of cognition using linear and non-linear classifiers. *Res. J. Appl. Sci. Eng. Technol.* 2015; 11:623–629
24. Kaufmann SJ, Eastaugh JL, Snowden S, Smye SW, Sharma V. The application of neural networks in predicting the outcome of in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 1997; 12:1454–1457
25. Khamisi F, Armstrong DT, Zhang X. Expression of urokinase-type plasminogen activator in human preimplantation embryos. *Mol. Hum. Reprod.* 1996; 2:273–276
26. Khosravi P, Kazemi E, Zhan Q, Malmsten JE, Toschi M, Zisimopoulos P, et al. Deep learning enables robust assessment and selection of human blastocysts after in vitro fertilization. *npj Digit. Med.* 2019; 2:1–9
27. Krisher RL, Schoolcraft WB, Katz-jaffe MG. Omics as a window to view embryo viability. *Fertil. Steril.* 2015; 103:333–341
28. Lee DM, Lee TK, Song HB, Kim CH. The expression of matrix metalloproteinase-9 in human follicular fluid is associated with in vitro fertilisation pregnancy. *BJOG An. Int. J. Obstet. Gynaecol.* 2005; 112:946–951
29. Leonard PH, Charlesworth MC, Benson L, Walker DL, Fredrickson JR, Morbeck DE. Variability in protein quality used for embryo culture: Embryotoxicity of the stabilizer octanoic acid. *Fertil. Steril.* 2013; 100:544–549
30. Lindgren KE, Yaldir FG, Hreinsson J, Holte J, Sundström-poromaa I, Kaihola H, et al. Differences in secretome in culture media when comparing blastocysts and arrested embryos using multiplex proximity assay. *Ups J. Med. Sci.* 2018; 123:143–152
31. Manna C, Nanni L, Lumini A. Artificial intelligence techniques for embryo and oocyte classification. *Reprod. Biomed. Online* 2013; 26:42–49
32. Matusėvičius A, Dirvanauskas D, Maskeliūnas R, Raudonis V. Embryo cell detection using regions with convolutional neural networks. *CEUR Workshop Proc.* 2017; 1856:89–93
33. Milewski R, Kuczyńska A, Stankiewicz B, Kuczyński W. How much information about embryo implantation potential is included in morphokinetic data? A prediction model based on artificial neural networks and principal component analysis. *Adv. Med. Sci.* 2017; 62:202–206
34. Miyagi, Y. Feasibility of deep learning for predicting live birth from a blastocyst image in patients classified by age. *Reprod. Med. Biol.* 2019; 18:190–203
35. Najafabadi MM, Villanustre F, Khoshgoftaar TM, Seliya N, Wald R, Muharemagic, E. Deep learning applications and challenges in big data analytics. *J. Big Data* 2015; 2:1–21
36. Qiu J, Li P, Dong M, Xin X, Tan J. Personalized prediction of live birth prior to the first in vitro fertilization treatment: a machine learning method. *J. Transl. Med.* 2019; 18:1–8
37. Rad R, Saeedi P, Au J, Havelock J. Blastomere cell counting and centroid localization in microscopic images of human embryo. *IEEE 20th Int. Work Multimed Signal Process MMSP 2018* 2018:1–6
38. Robertson SA. GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007; 18:287–298
39. Rocha J, Nogueira M, Zaninovic N, Hickman C. Is AI assessment of morphokinetic data and digital image analysis from time-lapse culture predictive of implantation potential of human embryos? *Fertil Sterility Sci. Congr. Suppl. Oral. Poster Sess. Abstr.* 2018; 110:E373
40. Rocha JC, Passalia FJ, Matos FD, Takahashi MB, Ciniciato DDS, Maserati MP, et al. A Method Based on Artificial Intelligence To Fully Automate The Evaluation of Bovine Blastocyst Images. *Npj Digit. Med.* 2017; 7:1–10
41. Simopoulou M, Sfakianoudis K, Maziotis E, Antoniou N, Rapani A, Anifandis G, et al. Are computational applications the “crystal ball” in the IVF laboratory? The evolution from mathematics to artificial intelligence. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2018; 35:1545–1557
42. Tarahomi M, de Melker A, van Wely M, Hamer G, Repping S, Mastenbroek S. pH stability of human preimplantation embryo culture media: effects of culture and batches. *RBMO 2018*; 37:409–414
43. Thouas GA, Dominguez F, Green MP, Vilella F, Simon C, Gardner DK. Soluble ligands and their receptors in human embryo development and implantation. *Endocr. Rev.* 2015; 36:92–130
44. Tran D, Cooke S, Illingworth PJ, Gardner DK. Deep learning as a predictive tool for fetal heart pregnancy following time-lapse incubation and blastocyst transfer. *Hum. Reprod.* 2019; 34:1011–1018
45. Uyar A, Bener A, Ciray H. Predictive modelling of implantation outcome in an in vitro fertilization setting: an application of machine learning methods. *Med. Decis. Mak.* 2015; 35:714–725
46. Vanneschi L, Castelli M. Multilayer Perceptrons. *Encycl Bioinforma Comput Biol* 2018; 1:1–9
47. Wald M. Computational models for prediction of IVF / ICSI outcomes with surgically retrieved spermatozoa. *Reprod. Biomed. Online* 2005; 11:325–331
48. Zador A. A critique of pure learning and what artificial neural networks can learn from animal brains. *Nat. Commun.* 2019; 10
49. Zaninovic N, Rocha JC, Zhan Q, Toschi M, Malmsten J, Nogueira M, et al. Application of artificial intelligence technology to increase the efficacy of embryo selection and prediction of live birth using human blastocysts cultured in a time-lapse incubator. *Fertil. Sterility Sci. Congr. Suppl. Oral. Poster Sess. Abstr.* 2018; 110:e372



A solution as unique as your business

At CooperSurgical, we partner with you to drive clinical efficiency



ORIGIO · SAGE · Humagen · TPC · K-Systems · RI · Wallace · LifeGlobal · CooperGenomics

fertility.coopersurgical.com

CooperSurgical
Fertility and Genomic Solutions

FORMACIÓN CONTINUADA

USO DE LA CATALOGACIÓN EMBRIONARIA DE ASEBIR Y DE LA TECNOLOGÍA *TIME-LAPSE* EN LOS LABORATORIOS DE FIV

USE OF ASEBIR GRADING SYSTEM AND TIME-LAPSE TECHNOLOGY IN THE IVF LABORATORY

Autores: GRUPO DE INTERÉS EN EMBRIOLOGÍA ASEBIR

Martínez-Moro A. IVF Spain Madrid (Madrid) **Cairó O.** CIRH. Centro de Infertilidad y Reproducción Humana (Barcelona), **García-Belda A.** Hospital Universitario La Paz (Madrid) **Cabello Y.** Overture Life, Madrid, España. Hospital Ruber Juan Bravo Quironsalud (Madrid) **Carrasco B.** Institut Universitari Dexeus (Barcelona) **Cuadros M, Cuevas-Sáiz I.** Hospital General Universitario de Valencia **Delgado A.** Instituto Valenciano de Infertilidad (Valencia) **Figuroa-García M.J.** Hospital Costa del Sol (Marbella) **Muñoz J.** HM Fertility Center (Toledo) **Pons MC.** Institut Universitari Dexeus (Barcelona) **Rives N.** Barcelona IVF (Barcelona) **Hurtado de Mendoza M.V.**
Email: a.martinez.moro@gmail.com

► RESUMEN

La incorporación de la tecnología *time-lapse* (TL) a los laboratorios de reproducción humana asistida (RHA) ha supuesto el acceso a una nueva fuente de información en la valoración embrionaria. La visualización dinámica embrionaria mediante TL ha facilitado el desarrollo de algoritmos que puedan ser utilizados en la selección embrionaria. Hasta su aparición, la valoración morfológica clásica suponía el método más empleado para seleccionar los embriones con mayor potencial. El objetivo del Grupo de Interés en Embriología (GIE) de ASEBIR mediante este artículo es evaluar el impacto de la tecnología TL en los laboratorios de fecundación *in vitro* y la convivencia de ambos métodos de categorización. Se elaboró una encuesta dirigida a todos los asociados que fue respondida por 166 embriólogos. Los resultados muestran una amplia aceptación de esta tecnología como fuente de información y concordancia con la gradación embrionaria de ASEBIR. Si bien es cierto, existen eventos de visualización dinámica que no son recogidos por la clasificación ASEBIR. Los sistemas TL son utilizados como métodos de selección embrionaria complementarios a la clasificación morfológica clásica.

PALABRAS CLAVE: *Time-lapse imaging, Embryo Culture Techniques, Single Embryo Transfer, Embryo Implantation, Female, Humans, Kinetics.*

FORMACIÓN CONTINUADA

USO DE LA CATALOGACIÓN EMBRIONARIA DE ASEBIR Y DE LA TECNOLOGÍA TIME-LAPSE EN LOS LABORATORIOS DE FIV

INTRODUCCIÓN

La reproducción humana asistida (RHA) es un campo multidisciplinar de la medicina donde diferentes profesionales de diversas ramas de la ciencia se unen para conseguir el nacimiento de un niño sano. Este objetivo supone un estímulo para la comunidad científica, que ve necesario llevar a cabo una mejora metodológica constante recurriendo a diferentes técnicas de selección embrionaria tanto invasivas como no invasivas.

La selección morfológica embrionaria es la herramienta más extendida en los laboratorios de reproducción asistida. Esta valoración se basa en la observación estática de varios parámetros diferenciables de morfología embrionaria, relacionados con una determinada capacidad de implantación. Además de la pérdida de información debido a la evaluación puntual, el principal inconveniente es la alteración de las condiciones de cultivo por la extracción de los embriones del incubador en repetidas ocasiones a lo largo del desarrollo embrionario.

Existen diferentes clasificaciones embrionarias publicadas por sociedades científicas, siendo la más utilizada en los centros españoles la clasificación morfológica propuesta por la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR). La creación de la Comisión de trabajo de ASEBIR en 2004 culminó con la publicación en 2007 de la 1ª clasificación morfológica con una revisión en 2015 (Hurtado de Mendoza et al., 2015) y cuya última actualización corresponde al año 2018 (Cuevas-Saiz et al., 2018). Este sistema de clasificación estableció las bases para un mayor consenso entre los distintos laboratorios, necesario para reducir la variabilidad intra- e inter- observador.

La clasificación de embriones propuesta por ASEBIR se basa en el análisis morfológico de diversos parámetros que están relacionados de manera evidente con la probabilidad de implantación del embrión.

La tecnología TL supone un complemento muy útil en la práctica diaria del laboratorio de fecundación *in vitro* (FIV). La selección embrionaria mediante esta tecnología es una herramienta no invasiva, que complementa a la valoración morfológica clásica y en la que se tiene en cuenta el tiempo en el que ocurren los diferentes eventos celulares (morfofocinética). Estos sistemas toman fotografías cada 5-15 minutos generando una secuencia de imágenes que, unidas en un vídeo, permiten al embriólogo obtener una visión continua del desarrollo embrionario.

El *timing* de eventos en TL se refiere a aquellas variables del desarrollo que ocurren en todos los embriones. Algunos de los considerados más importantes son:

- t0: Momento de inseminación
- tPB2: Extrusión completa del 2º CP
- tPN: Aparición de los pronúcleos.
- tPNf: Desaparición de los PN
- t2 a t9: 2 células, 3 células, ...
- tSB: Inicio de la blastulación

Desde que Payne et al., en 1997 utilizaron por primera vez la tecnología TL para estudiar la fecundación humana (Payne et al., 1997), se han publicado numerosos estudios acerca de la relación entre morfofocinética embrionaria, su llegada a blastocisto y la capacidad predictiva de implantación (Wong et al., 2010; Meseguer et al., 2011). Posteriormente, estos hallazgos pudieron ser validados en un ensayo clínico controlado aleatorizado (ECCA) (Rubio et al., 2014) en el que, gracias al uso de su algoritmo predictivo de implantación, demostraron una mejoría en los resultados reproductivos.

Otros ECCAs han tratado de demostrar el valor añadido que realmente ofrece en la práctica clínica la reducción de la manipulación de embriones en un ambiente de cultivo estable, un *software* de selección embrionario o los dos frente a incubadores y selección embrionaria tradicionales. Según la última revisión publicada en la base de datos Cochrane, no hay evidencia científica suficiente que demuestre la superioridad de los incubadores TL frente a los convencionales en cuanto a embarazo clínico o recién nacido vivo (Armstrong et al., 2019). Sin embargo, resulta complicado comparar ECCAs por las diferencias en los diseños de los ensayos, así como el carácter multifactorial de la implantación (Kovacs and Lieman, 2019).

Otros autores han utilizado la tecnología TL para seleccionar aquellos embriones con menor probabilidad de presentar aneuploidías, obteniéndose resultados controvertidos. Campbell et al., crearon un modelo de clasificación embrionaria que minimizaría el riesgo de seleccionar un embrión aneuploide (Campbell et al., 2013). Basile et al., observaron una relación entre el comportamiento morfofocinético de los embriones y su dotación cromosómica creando un algoritmo capaz de aumentar la probabilidad de transferencia de embriones euploides de manera no invasiva (Basile et al., 2014). Sin embargo, otros autores no encontraron diferencias en la morfofocinética de embriones euploides y aneuploides durante su desarrollo hasta el estadio de blastocisto (Rienzi et al., 2015; Yang et al., 2014).

Independientemente de su aplicación como sistema predictivo de implantación o dotación cromosómica y la me-

FORMACIÓN CONTINUADA

USO DE LA CATALOGACIÓN EMBRIONARIA DE ASEBIR Y DE LA TECNOLOGÍA TIME-LAPSE EN LOS LABORATORIOS DE FIV

jora en los resultados reproductivos de los que puedan beneficiarse los pacientes, es innegable que la incorporación de los sistemas TL ofrece un inmenso valor añadido a los laboratorios de FIV. Por todo lo expuesto anteriormente, el Grupo de Interés en Embriología (GIE) de ASEBIR se ha planteado la reconsideración del criterio morfológico actual ante la posibilidad de aumentar su valor pronóstico incorporando el conocimiento que aportan los sistemas TL.

MATERIAL Y MÉTODOS

A fin de conocer la opinión de los usuarios TL de la catalogación ASEBIR en laboratorios que disponen de sistemas TL para la valoración embrionaria, se confeccionó una encuesta que fue enviada a los socios de ASEBIR. La encuesta constaba de 10 preguntas con distintas modalidades de respuesta en las que se buscaba analizar los parámetros morfológicos que ASEBIR considera más importantes, los acontecimientos cinéticos más relevantes, así como aspectos controvertidos que pudieran ser de interés para la selección embrionaria.

“Encuesta ASEBIR sobre la valoración morfológica clásica vs Time-lapse (TL)”

1. ¿Cómo es tu centro de trabajo?

- Privado.
- Público.

2. ¿Cómo utilizas la tecnología TL en tu laboratorio para la valoración y selección embrionaria?

- Priorizo la morfología clásica a la cinética embrionaria. Utilizo la cinética para seleccionar entre dos embriones con la misma clasificación morfológica.
- Priorizo la cinética embrionaria en la selección de los embriones independientemente de la clasificación basada en la morfología clásica.
- Utilizo únicamente el algoritmo preestablecido que proporciona el sistema TL.
- Utilizo únicamente un algoritmo de selección propio, validado en mi centro.

3. ¿Cuál ha sido la mejora derivada de la utilización de la tecnología TL? (Puedes seleccionar más de una opción).

- Optimización de las condiciones de cultivo.
- Como complemento de la clasificación morfológica clásica.
- Facilita la selección embrionaria.
- Facilita la organización del laboratorio.

4. ¿Consideras que la clasificación embrionaria ASEBIR concuerda con la valoración morfofocinética?

- En la mayoría de los casos concuerda.
- Por lo general, morfofocinética y morfología no concuerdan.
- No utilizo la clasificación embrionaria ASEBIR.

5. ¿Crees realmente que la tecnología TL ha supuesto una mejora en el éxito de los tratamientos en tu centro?

- Sí.
- No.

6. Los sistemas TL aportan información que mediante la visualización puntual no seríamos capaces de percibir como son las divisiones irregulares. ¿Consideras estos eventos como un parámetro negativo?

- No. Valoramos y ordenamos según la clasificación ASEBIR.
- Sí, modificamos la clasificación ASEBIR y lo penalizamos.
- Sí, solo se transferiría o congelaría al embrión como última opción de la cohorte embrionaria.

7. En caso de ver que todos o la mayoría de los embriones de una paciente presenta numerosas divisiones irregulares (directas o reversas). ¿Se plantea algún complemento en la selección embrionaria?

- No se propone nada y se transfiere y/o congelan aquellos con menos alteraciones.
- Realizar cultivo largo en caso de que no se hubiera planteado anteriormente.
- Proponer PGT-A.

8. ¿Qué sistema es más utilizado en vuestro laboratorio?

- Eeva®
- Embryoscope®
- Geri®
- MIRI-TL®
- Primo Vision®

9. ¿Proporcionas los vídeos del desarrollo de los embriones a los pacientes?

- No.
- Sí.
- Solo de los embriones transferidos o congelados.

FORMACIÓN CONTINUADA

USO DE LA CATALOGACIÓN EMBRIONARIA DE ASEBIR Y DE LA TECNOLOGÍA TIME-LAPSE EN LOS LABORATORIOS DE FIV

10. ¿Realizas en tu centro controles de calidad tanto morfológicos como morfocinéticos?

- Sí, tenemos controles de calidad internos.
- Sí, tenemos controles de calidad externos.
- Sí, tenemos controles de calidad internos y externos.
- No, pero realizamos las valoraciones embrionarias en equipo.
- No, no lo consideramos necesario.

embriones con la misma gradación embrionaria. En relación a la concordancia entre los incubadores TL y la evaluación morfológica clásica, el 73% de los participantes no observa diferencias en las gradaciones aportadas por ambos métodos de selección frente a un 8% que considera los resultados no concordantes. Un 19% no ha podido valorar esta relación de TL y la gradación de ASEBIR puesto que emplean otras clasificaciones de selección morfológica.

Respecto a la percepción de mejora de los tratamientos en sus centros de RHA, es indudable la buena acogida que han tenido los incubadores TL por parte de los embriólogos, ya que el 86% de ellos opina que el uso de un incubador TL ha aumentado el éxito de los tratamientos gracias a la acción conjunta de varios aspectos: la optimización de las condiciones de cultivo, como complemento de la clasificación morfológica clásica, facilitando una mejor selección embrionaria y la organización de las tareas diarias del laboratorio.

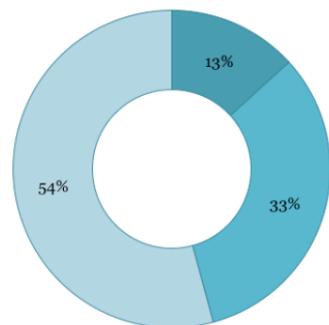
Hay ciertos eventos como las divisiones irregulares (tricotómicas, rápidas y reversas) que han sido observadas gracias a los incubadores TL. En relación a estas irregularidades del desarrollo, la mayoría de los usuarios de TL (54%) sí tienen en cuenta estos eventos en el desarrollo embrionario, modificando los criterios de clasificación morfológica de ASEBIR, mientras que un 33% solo transferiría este tipo de embriones como última opción de la cohorte embrionaria (Figura 1).

RESULTADOS

De los socios ASEBIR consultados, se han obtenido 166 respuestas. La mayoría de los encuestados pertenecen a centros privados, correspondiendo minoritariamente un 12% a trabajadores en centros públicos.

En cuanto al uso de la clasificación morfológica clásica o la clasificación basada en la cinética embrionaria, los dos métodos de selección son utilizados en muchos laboratorios de reproducción asistida, por lo que era preciso valorar la convivencia y concordancia entre ambas técnicas. La mayoría (87%) de los encuestados prioriza la morfología clásica a la cinética embrionaria, utilizando la cinética para seleccionar entre dos

¿Consideras las divisiones irregulares como un parámetro negativo?



- No. Valoramos y ordenamos según la clasificación ASEBIR.
- Sí, sólo se transferiría o congelaría al embrión como última opción de la cohorte embrionaria.
- Sí, modificamos la clasificación ASEBIR y lo penalizamos.

Figura 1. Divisiones irregulares.

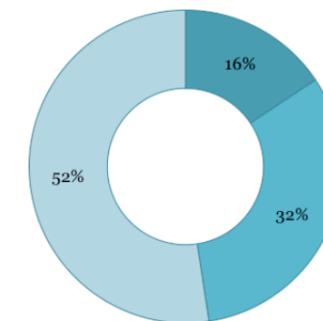
FORMACIÓN CONTINUADA

USO DE LA CATALOGACIÓN EMBRIONARIA DE ASEBIR Y DE LA TECNOLOGÍA TIME-LAPSE EN LOS LABORATORIOS DE FIV

Haciendo hincapié en los eventos irregulares, se planteó una situación clínica en la que el embriólogo realizaría una valoración embrionaria encontrando un número considerable de embriones con divisiones irregulares en la cohorte de una paciente. La resolución mayoritaria entre los encuestados es la de prolongar el cultivo embrionario hasta

estadio de blastocisto (52%). Un 32%, sin embargo, transferiría/congelaría aquellos embriones con menos alteraciones. Finalmente, el 16% optaría por realizar un diagnóstico genético preimplantacional (PGT-A) en este tipo de casos (Figura 2).

¿Se plantea algún complemento en la selección embrionaria al observar divisiones irregulares?



- Proponer PGT-A.
- No se propone nada y se transfiere y/o congelan aquellos con menos alteraciones.
- Realizar cultivo largo en caso de que no se hubiera planteado anteriormente.

Figura 2. Complementos en la selección embrionaria

Los sistemas TL han ido evolucionando y son cada vez más las marcas comerciales que ofertan este tipo de incubadores. Obviando cuestiones económicas y condiciones de cultivo de cada uno de ellos, los más utilizados son: Embrýoscope® (52%), Geri® (34%), MIRI-TL® (8%) y Primo Vision® (6%).

La gran controversia generada en torno al TL no se reduce únicamente a la efectividad de los algoritmos del TL, sino que también está relacionado con la posibilidad de proporcionar las imágenes y videos generados durante el desarrollo embrionario. La encuesta ha desvelado que el 56% proporciona los videos de los embriones a los pacientes ya sean los transferidos y/o vitrificados (37%) o de la totalidad de los embriones generados (19%), mientras que el 44% restante mantiene el visionado exclusivamente para el personal del laboratorio.

Uno de los aspectos clave en los que se basan los detractores de las clasificaciones morfológicas clásicas, como es el criterio ASEBIR, es la falta de pericia por parte de los observadores, lo cual puede añadir una variabilidad intra- e inter- observador. De todos modos, esta problemática no solo ocurre en la evaluación morfológica embrionaria, sino que también puede darse en la morfocinética. Las respues-

tas obtenidas muestran que un 63% considera importante la realización de controles de calidad, ya sean internos o externos. El 37% no realizan controles de calidad de ningún tipo, si bien es cierto, el 33% realizan las valoraciones embrionarias en equipo, por lo que se reduce la variabilidad existente entre observadores. Probablemente lo que más llama la atención es el 4% que no considera necesarios los controles de calidad y tampoco hacen una valoración embrionaria conjunta (Figura 3).

CONCLUSIONES

La incorporación de los sistemas TL en los laboratorios de reproducción asistida ha supuesto una mejora sustancial en la selección de embriones con mejor potencial evolutivo según se desprende de los resultados de la encuesta. Los centros disponían de sistemas de categorización morfológica embrionaria como único método de selección y, la incorporación de esta nueva tecnología, ha permitido que muchos de ellos añadan la cinética como método de selección complementario. De hecho, la gran mayoría emplean de manera conjunta la cinética y la morfología.

FORMACIÓN CONTINUADA

USO DE LA CATALOGACIÓN EMBRIONARIA DE ASEBIR Y DE LA TECNOLOGÍA TIME-LAPSE EN LOS LABORATORIOS DE FIV

¿Realizas controles de calidad en tu centro?



Figura 3. Control de calidad

Con el fin de averiguar si los sistemas TL desplazaban la clasificación morfológica de ASEBIR, se realizó una encuesta con preguntas de respuesta única o multirespuesta, respondida por 166 socios. Las preguntas 2, 3 y 5 pretendían recabar información acerca de la importancia de los sistemas TL, comprobando que la gran mayoría de los centros consideran que estos sistemas de incubación han mejorado los resultados de los centros. La optimización de las condiciones de cultivo, su utilización como complemento de la clasificación morfológica de ASEBIR para facilitar la selección embrionaria, e incluso simplificar la organización del laboratorio, son algunas de las ventajas que han aportado los sistemas TL. Desde un punto de vista bibliográfico, los estudios muestran la existencia de diversos marcadores asociados con un desarrollo embrionario óptimo. Inicialmente los trabajos sugieren la existencia de una relación entre la formación del blastocisto con parámetros previos al estadio de 4 células (Wong et al., 2010). La evolución de los marcadores TL ha hecho posible la selección de embriones con mayor probabilidad de implantación (Meseguer et al., 2011; Rubio et al., 2014) e incrementar las tasas de recién nacido vivo (Pribenszky et al., 2017).

Los sistemas TL han aportado información sobre ciertos eventos no observables en las valoraciones puntuales al microscopio si los embriones eran cultivados en incubadores convencionales. La fecundación anómala o las divisiones celulares anormales son eventos que se relacionan con un desarrollo embrionario inadecuado y solo son detectables mediante TL. La bibliografía ha demostrado que estos eventos reducen el éxito de los tratamientos en términos de desarrollo embrionario e implantación (Milewski and Ajduk, 2017). Es por ello que las preguntas 6 y 7 van orientadas al manejo en los laboratorios de este tipo de si-

tuaciones, observando que se realiza una modificación en la gradación de embriones de ASEBIR en la mayoría de los casos, aportando un margen de maniobra reducido al cultivo largo, diagnóstico genético o emplear esos embriones como último recurso. Estas situaciones sugieren la necesidad de revisar el manejo de algunos eventos no recogidos en la clasificación morfológica embrionaria.

La realidad sobre los sistemas TL es que aportan gran cantidad de información adicional, tanto a nivel cinético como a nivel de acontecimientos no observados previamente para la selección del embrión con mejor potencial de éxito, lo que permite el desarrollo de algoritmos predictivos que podrían ser un complemento a la clasificación morfológica clásica. En este sentido, se planteó la pregunta 4 para tener una perspectiva de la concordancia entre la clasificación morfológica de ASEBIR y los algoritmos establecidos por los sistemas TL. El hecho de que el 73% de los encuestados consideren que los sistemas TL y la clasificación ASEBIR son coincidentes refuerza la utilización de los criterios morfológicos ASEBIR en la selección de los embriones con un mayor potencial de implantación y recién nacido vivo (Pons et al., 2014; Hurtado de Mendoza et al., 2015; Cuevas Saiz et al., 2018), y no solo en aquellos centros que carezcan de TL, sino también como herramienta conjunta a los algoritmos existentes.

La pregunta número 10 pretendía determinar la valoración de los laboratorios sobre los controles de calidad para establecer la categoría correspondiente a cada embrión. Este interés reside fundamentalmente en el objetivo de estandarizar procesos y reducir la variabilidad inter- e intra-observadores en el manejo de la gradación embrionaria de ASEBIR. En este sentido, la problemática en la variabilidad se traslada también a la evaluación de los eventos

FORMACIÓN CONTINUADA

USO DE LA CATALOGACIÓN EMBRIONARIA DE ASEBIR Y DE LA TECNOLOGÍA TIME-LAPSE EN LOS LABORATORIOS DE FIV

cinéticos, por lo que es necesario implementar controles de calidad que reduzcan estas posibles discrepancias. La participación en controles de calidad internos y especialmente externos fomenta la reducción de diferencias entre laboratorios (Martínez-Granados et al., 2017). Los resultados muestran la concienciación sobre la necesidad de tener un consenso a la hora de establecer la gradación embrionaria, ya sea a través de controles de calidad externos, internos, ambos, o a la valoración embrionaria conjunta entre miembros del equipo.

La selección del mejor embrión para transferir es un factor esencial en los laboratorios de reproducción asistida, especialmente para reducir el número de transferencias necesarias para lograr un embarazo a término. La implementación de los sistemas TL ha aportado información relevante para poder elegir y/o descartar embriones que mediante la valoración puntual podrían haber sido la primera elección de transferencia. La información que pueda aportar el TL no recogida en la gradación ASEBIR, abre una nueva vía de mejora y actualización en la clasificación elaborada por el GIE, al tiempo que reafirma su validez ante la concordancia observada por un buen número de embriólogos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Armstrong S, Bhide P, Jordan V, Pacey A, Marjoribanks J, Farquhar C. Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019 05 29;5:CD011320.
- Basile N, Nogales MdC, Bronet F, Florensa M, Riqueiros M, Rodrigo L, et al. Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis. *Fertil Steril.* 2014 Mar;101(3):699-704.
- Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Hickman CFL. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod Biomed Online.* 2013 May;26(5):477-85.
- Cuevas Saiz I, Carme Pons Gatell M, Vargas MC, Delgado Mendi-ve A, Rives Eneaduguila N, Moragas Solanes M, et al. The Embryology Interest Group: updating ASEBIR's morphological scoring system for early embryos, morulae and blastocysts. *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica.* 2018 January 1;5(1):42-54.
- Hurtado de Mendoza, M., Cuadros, J., Arroyo, G., Ten, J., Pons, M., Prados, F., González, B., Múgica, A., Rives, N., Cuevas, I., Figueroa, M., Cuadros, M., Calderón, G., Moragas, M., Torelló, M., Vilches, M., Busquets, A., De los Santos, M., 2015. "II Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos" Cuadernos de Embriología

Kovacs P, Lieman HJ. Which embryo selection method should be offered to the patients? *Journal of assisted reproduction and genetics.* 2019;36(4):603-5.

Martínez-Granados L, Serrano M, González-Utor A, Ortiz N, Badajoz V, Olaya E, et al. Inter-laboratory agreement on embryo classification and clinical decision: Conventional morphological assessment vs. time lapse. *PLOS ONE.* 2017 25-ago;12(8):e0183328.

Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remohí J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod.* 2011 Oct;26(10):2658-71.

Milewski R, Ajduk A. Time-lapse imaging of cleavage divisions in embryo quality assessment. *Reproduction.* 2017 -08;154(2):R37-53.

Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod.* 1997 Mar;12(3):532-41.

Pons MC, de los Santos, María José, Múgica A, Vilches MÁ, Arroyo G, González B, et al. Grupo de Interés de Embriología de ASEBIR: estudio multicéntrico para la validación del criterio ASEBIR de valoración morfológica de embriones tempranos en día +3 y su asociación con la tasa de nacido vivo. *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica.* 2014 December 1;1(2):50-5.

Pribenszky C, Nilselid A, Montag M. Time-lapse culture with morphokinetic embryo selection improves pregnancy and live birth chances and reduces early pregnancy loss: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2017 -11;35(5):511-20.

Rienzi L, Capalbo A, Stoppa M, Romano S, Maggiulli R, Albricci L, et al. No evidence of association between blastocyst aneuploidy and morphokinetic assessment in a selected population of poor-prognosis patients: a longitudinal cohort study. *Reprod Biomed Online.* 2015 Jan;30(1):57-66.

Rubio I, Galán A, Larreategui Z, Ayerdi F, Bellver J, Herrero J, et al. Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope. *Fertil Steril.* 2014 Nov;102(5):1287,1294.e5.

Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM, et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol.* 2010 Oct;28(10):1115-21.

Yang Z, Zhang J, Salem SA, Liu X, Kuang Y, Salem RD, et al. Selection of competent blastocysts for transfer by combining time-lapse monitoring and array CGH testing for patients undergoing preimplantation genetic screening: a prospective study with sibling oocytes. *BMC Med Genomics.* 2014 Jun 22;7:38.

JÓVENES ASEBIR

FORMACIÓN DE EMBRIÓLOGOS CLÍNICOS

La experiencia de Irene Cuevas

En la edición anterior mostrábamos cómo de complicado podía resultar para un embriólogo conseguir la formación suficiente para ejercer la embriología con cierta garantía.

A través de esta recién inaugurada sección en la revista ASEBIR, queremos animar a aquellos profesionales que se dedican a la embriología y que no se han decidido a adentrarse en el mundo de la formación voluntaria para ayudar en aquello que en alguna ocasión todos hemos necesitado: PRÁCTICA.

Contamos con la experiencia de Irene Cuevas Sáiz, responsable del Laboratorio del Hospital General Universitario de Valencia que, como muchos otros profesionales en España, tiene larga experiencia en la formación de embriólogos que necesitan ese empujón tan necesario en sus inicios y que además, durante mucho tiempo lo ha venido desempeñando voluntariamente.

Una de las asignaturas pendientes en nuestro sistema de salud es el reconocimiento de nuestra profesión como una especialidad dentro del ámbito sanitario. Hasta que esta circunstancia ocurra, las competencias de un embriólogo clínico solo se pueden adquirir mediante la formación tanto teórica como práctica específica.

A nivel nacional, tenemos disponibles una amplia gama de programas de formación con este objetivo: másteres oficiales

y no oficiales, títulos propios... ligados a diferentes universidades. En todos ellos, se adquieren unos conocimientos teóricos no solo de la parte de laboratorio de embriología, sino también de legislación, fisiología, patología, diagnóstico, y un largo etcétera.

Respecto a la parte práctica, los períodos de formación difieren bastante entre los diversos programas, pero lo que es evidente es que un embriólogo clínico necesita una formación práctica lo suficientemente dilatada para que le permita adquirir habilidad suficiente, no solo en el manejo de las técnicas de laboratorio, sino también para la gestión del laboratorio y la toma de decisiones de nuestra práctica clínica diaria, entre otras muchas funciones. Y eso no se aprende en un par de meses, sino que exige una formación prolongada y continuada de los profesionales, cuanto más de nuestros embriólogos junior.

JÓVENES ASEBIR

FORMACIÓN DE EMBRIÓLOGOS CLÍNICO



Una vez llegue la especialidad de embriología clínica, que seguro llegará, la formación dentro de nuestra profesión estará ligada, como en otras especialidades, a una residencia. Pero mientras esto ocurre, algunos centros tenemos la suerte de poder formar embriólogos clínicos.

En el Hospital General de Valencia contamos con un plan de formación promovido por la Unidad de Investigación y Docencia que nos permite formar embriólogos compaginándolo con nuestra labor asistencial. Comenzamos con el programa de formación poco después de iniciar la actividad en la Unidad de Medicina Reproductiva, allá por el 2005. Desde entonces, solo el maldito COVID nos ha interrumpido la formación, y afortunadamente acabamos de recibir el permiso para retomarla.

Es un orgullo y una enorme satisfacción ver cómo tras su paso por nuestra unidad, cada uno de ellos ha continuado con su carrera profesional. Encontrarnos en cursos, congresos, reuniones y recordar sus días con nosotros, porque cada uno se lleva su propia experiencia, pero deja en nosotros mucho más de lo que se llevan.

Y es que cuando piensas en la formación, en la adquisición de conocimientos, puede parecer algo unidireccional, pero siempre es un proceso recíproco y, sinceramente, creo que el formar profesionales es un proceso egoísta. Sí, sí, egoísta, porque siempre he creído que yo ganaba más que ellos. Nuestros embriólogos junior llegan a la unidad con una formación teórica excelente, pero por lo general con poca práctica clínica o al menos diferente a la nuestra. Y llegan con muchas ganas de aprender. Muchísimas. Y con muchas preguntas, lo que supone un reto profesional constante. El poder dar respuestas o al menos saber guiarles en la búsqueda de las mismas, supone una actualización continua y mantenerse al día de las últimas novedades en nuestro campo.

Nunca tenemos todas las respuestas, por supuesto. Algunas veces puede que el tema sobre el que se nos pregunta ni siquiera generara interés hasta que algún estudiante nos abre los ojos.

Muchas veces también se cuestiona la forma de trabajo, los protocolos, y un largo etcétera. Y mientras todo esto ocurre van adquiriendo conocimientos de la parte práctica. Como es lógico, nuestros junior necesitan también ir rellenando sus currículums, y para ello siempre les animamos a presentar comunicaciones a los diferentes congresos nacionales e internacionales. Buscamos temas que les han resultado interesantes, sus propios TFM realizados en nuestra unidad, preguntas que nos han realizado y han quedado sin resolver, y todo ello supone siempre manejo de las bases de datos, búsqueda de resultados, bibliografía, o incluso practicar inglés, discutir resultados o algo tan trivial como el orden de autores de una comunicación. Al final todos ganamos, porque ellos van haciendo sus trabajos y nosotros seguimos publicando nuestro trabajo, algo que muchas veces no da tiempo debido a la carga del laboratorio.

Todos nuestros estudiantes participan en la actividad asistencial, en los proyectos de investigación, las comunicaciones a congresos, ayudan con la actualización de las bases de datos, con los registros, los controles de calidad y nos ayudan (obligan) a mantenernos actualizados. Cada uno con su personalidad, sus inquietudes, sus proyectos.

Los vemos crecer como profesionales. Y todo eso solo a cambio de formación práctica ¿es o no es un proceso egoísta? Siempre ganamos nosotros. Nos quedamos con un trocito de cada uno de ellos.

Por todo ello, me gustaría animar a otros compañeros a que colaboraran en la formación de embriólogos ya que sabemos que la demanda es mayor que la formación ofertada en la actualidad.



JÓVENES ASEBIR

REPORTAJE / ENTREVISTA

Y como consecuencia de actos tan generosos, solo pueden derivarse experiencias maravillosas que nos dejan alumnos que han tenido la oportunidad de formarse con alguien en algún momento de su vida. Os dejamos sus experiencias. ¿Querrás perderte todos estos sentimientos?

Si no lo haces aún, considera vivir esta experiencia.

Y ASÍ LO VIVEN DESDE EL OTRO LADO

Nº Socia
ASEBIR:
913

AILA COELLO PERLES

Embrióloga clínica. IVI Valencia



El periodo de formación me proporcionó la oportunidad de llevar a la práctica real todos los conocimientos adquiridos durante los estudios de posgrado, permitiéndome desarrollar las habilidades necesarias para la realización de las diferentes técnicas. Además, fomentó mi capacidad de toma de decisiones con criterio profesional, mejorando, por tanto, mis oportunidades de inserción en el mundo laboral.

Nº Socia
ASEBIR:
1306

ALBA SÁEZ CUEVAS

Embrióloga en Sistemas Genómicos



Soy licenciada en biotecnología. Recuerdo la experiencia de cursar prácticas extracurriculares como una de las mejores de mi vida profesional. Además de formarme como embrióloga y abrirme las puertas al mundo laboral, fueron capaces de transmitirme la pasión por el mundo de la reproducción asistida. Gracias.

Nº Socia
ASEBIR:
1031

ANA GARCÍA BELDA

Hospital Universitario La Paz, Madrid



Tras terminar el máster en RHA preparé un escuetísimo CV y finalmente, conseguí una entrevista en un centro donde se liberaba una de sus plazas de formación. Estaré siempre agradecida a las personas que me dieron la oportunidad de llamarles maestras y amigas, que con tanto cariño y paciencia compartieron todo su conocimiento conmigo y por las que nunca perderé las ganas de seguir aprendiendo.

Nº Socia
ASEBIR:
1240

ANA MUD VALERO

Instituto Malavé de Reproducción. Málaga



Tras cursar el Master de reproducción tuve la suerte de realizar prácticas voluntarias, pudiendo seguir mi formación. Aprendí a trabajar en equipo con personas con gran experiencia y eso me ha permitido sumar conocimientos y seguir con la misma motivación con la que inicié mis andaduras. Sigo poniendo en práctica todos los conocimientos adquiridos y trabajando con el mismo entusiasmo que ellos me transmitieron. Gracias por enseñarme con tanta pasión.

Nº Socia
ASEBIR:
924

ARTURO REYES

Instituto de Fertilidad Clínica Rincón



Quizás aún huérfanos de categoría profesional o de especialidad...pero sigue intacto el incentivo de haber recibido una formación práctica para asentar criterios, desarrollar competencias y alcanzar esa necesaria autonomía como embriólogo. Inestimable labor altruista y ejercicio de responsabilidad de los embriólogos/as más experimentados que la imparten. Gracias por esa oportunidad.

Nº Socia
ASEBIR:
912

CARLA OLMEDO ILLUECA

Hospital General Universitario de Valencia



Hacer prácticas me permitió completar mi formación en reproducción asistida, afianzar los conocimientos adquiridos en el máster, pero sobretodo me enseñó a ser embrióloga. Habilidades como trabajar en equipo, resolver problemas o gestionar el estrés, saber organizarse, ser disciplinado y comprometido, no se pueden aprender si no es practicando. Sin duda fue la oportunidad de mi vida.

Nº Socia
ASEBIR:
1200



IRIS MARTÍNEZ RODERO

Investigadora predoctoral en UAB

En 3º de carrera nos contaron que, con las prácticas, comprobaríamos si la profesión que teníamos pensada era nuestra vocación soñada. Aún recuerdo la ilusión con la que salí de aquel lugar dónde sorprendentemente me habían dado esa oportunidad. Gracias al equipo que me acogió hasta que tuve la formación suficiente para despegar en el mundo de la Embriología, hoy puedo estar aquí.

Nº Socia
ASEBIR:
1050



JOSE GABRIEL DESCALS FERRANDO

Sistemas Genómicos

Haber tenido la oportunidad de realizar prácticas en reproducción ha sido una de las mejores experiencias que he tenido en mi vida profesional. Siempre agradeceré al gran equipo que me acogió en su laboratorio, lo afortunado que me hicieron sentir y todo lo que aprendí (y lo bien que lo pasamos). La experiencia de haber ido de su mano hasta la entrada en el mundo laboral fue la mejor formación que he recibido. Gracias por todo.

Nº Socia
ASEBIR:
787



Mª IRENE RUBIO PALACIOS

Clinical Embryologist & Project Manager, IVI RMA Global

Tuve la oportunidad de estar un año de prácticas como embrióloga en un hospital público tras terminar mi máster. Literalmente todo el equipo me abrió las puertas de su casa, me acogió bajo su responsabilidad y enseñó todo lo que sabían. Mi mejor homenaje es intentar repetir lo vivido: enseñar con la misma pasión y dedicación que me ofrecieron a mí.

Nº Socia
ASEBIR:
788



JAVIER HERRERO ZAPATA

Donor Program Coordinator, IVI RMA Global

Las prácticas que pude realizar en un centro público de Valencia fueron mi primera experiencia en una unidad de Reproducción Asistida. Fue una gran oportunidad. Poder vivir esa pasión por lo que hacíamos, el trato tan personal con las pacientes y el buen ambiente que el equipo generaba fue una experiencia preciosa que ha marcado mi camino y que aún tengo muy presente. ¡Gracias!

Nº Socia
ASEBIR:
1539



VÍCTOR MANUEL CHAPERO CIURANA

Embriólogo CreateFertility

Cuando alguien pregunta "¿Qué hace falta para ser un buen embriólogo?" solemos centrarnos en aquellas cualidades meramente profesionales. No obstante, son cualidades como la empatía y la humanidad las que convierten a grandes profesionales en excelentes personas. Agradeceré eternamente la oportunidad que me dio en su momento una persona que aúna todas estas cualidades, sin la cual, hoy, no sería embriólogo.

Nº Socia
ASEBIR:
1041



MARTA MASIP DESCALS

UR IMED Valencia

Con una estancia formativa en un centro público de Valencia confirmé mi vocación. Siempre estaré agradecida a los compañeros, quienes, a pesar de su carga de trabajo, siempre se volcaron en mi formación. La formación práctica es, en mi opinión, esencial. He tenido la oportunidad de estar al otro lado, con alumnos en formación, y la experiencia siempre ha sido enriquecedora.

Nº Socia
ASEBIR:
1495



MARTA PALMA RODRÍGUEZ

Embrióloga en Create Fertility, Birmingham

Mi formación práctica como embrióloga comenzó con mis prácticas del máster y, posteriormente, tuve la suerte de alargar mi estancia en el mismo centro. Esta experiencia me ayudó a acceder a mi primer puesto como embrióloga. Recordaré y estaré siempre agradecida a todos los profesionales que han participado en mi formación y que han hecho posible que pueda cumplir este sueño.

Nº Socia
ASEBIR:
1005



NEREA DÍAZ HERNÁNDEZ

Embrióloga en Instituto Bernabeu

Tras finalizar el máster pude continuar mi formación en una Unidad de Reproducción. Debido a lo complicado que es encontrar un puesto en nuestro campo sin experiencia esta estancia resultó crucial para mí. Siempre estaré agradecida a todo el personal por haber sido imprescindibles en mi desarrollo profesional y darme la experiencia necesaria para que surgiesen grandes oportunidades.

JÓVENES ASEBIR

REPORTAJE / ENTREVISTA

Nº Socia
ASEBIR:
1337

CELIA ROMERO JÁTIVA

Embrióloga Ovoclinic



Mi estancia de formación fue la suerte de mi vida profesional y lo que marcó la diferencia para hacerme un hueco en el mercado laboral. Desde el primer día me hicieron sentir una más del equipo, y con mucho mimo me enseñaron la pasión y el respeto por la embriología, y que un buen trabajo es el resultado de muchos pequeños detalles. No puedo estar más agradecida y orgullosa de mis primeros pasos en la reproducción.

Nº Socia
ASEBIR:
1490

SARAI ARRONES OLMO

Embriologa - Imer Sevilla



Gracias a unas prácticas somos muchos los que nos hemos podido formar y adquirir la experiencia necesaria para entrar en el complicado mundo laboral, por lo que animo a los laboratorios a ofrecer esta oportunidad. Siempre estaré agradecida de haber entrado en este maravilloso mundo de la mano de alguien que compartió conmigo su tiempo, experiencia y conocimientos y que me transmitió su pasión por la embriología.

Nº Socia
ASEBIR:
978

DIANA MATARREDONA GILBERT

Evalo, Lugo



Mi estancia de prácticas fue la experiencia profesional más gratificante de mi vida y la base sobre la que desarrollar mi trabajo cada día. La profesionalidad y actitud del equipo que encontré son un referente para trabajar con ilusión y aprender de forma incansable. Aman lo que hacen y con ello crean un ambiente inmejorable que sirve para atraer el talento de jóvenes embriólogos que hacen crecer al grupo.

Nº Socia
ASEBIR:
1194

SILVIA MARÍN REAL

Embrióloga clínica de IVI Ibiza



Conseguir la experiencia necesaria para empezar a trabajar en el campo de la embriología puede llegar a ser complicado. Yo tuve la suerte de encontrar una embrióloga senior dispuesta a darme la oportunidad de crecer dentro de su gran equipo de profesionales. Gracias a esta directora de laboratorio, que fue una gran maestra, hoy puedo desarrollar esta profesión que tanto nos apasiona.

Si formas partes de un centro que permitiría hacer un periodo de formación voluntario mientras conseguimos la regularización de la Biología Sanitaria y la posterior Especialidad, ponte en contacto con nosotros a través del correo de la secretaría asebir@asebir.com o a través del correo de Jóvenes ASEBIR jovenes@asebir.com.

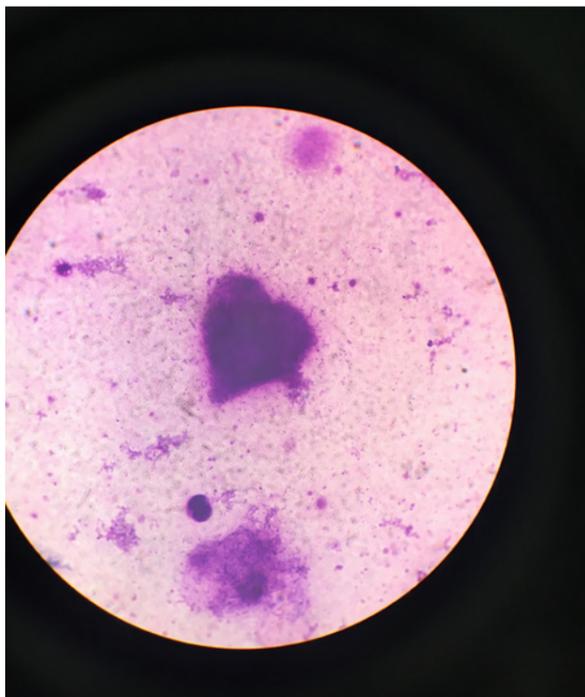
FORMA PARTE DE ESTA EXPERIENCIA. Ayúdanos a ayudar.

CONCURSO DE FOTOGRAFÍA ASEBIR

Título: Corazón

Autor: Paloma González Gómez

Socio ASEBIR: Nº 843



cmb 25 años
bizkaiko medikuen elkargoa
colegio de médicos de bizkaia
SEGURMEC
ASEGURU-ARTEKARITZA S.M.U.
CORREDURÍA DE SEGUROS S.L.U.

ASEBIR
Asociación para el Estudio
de la Biología de la Reproducción

Con el Seguro de Responsabilidad Civil Profesional de Segurmec puedes contratar un capital asegurado de hasta 1 200 000 €

Incluye coberturas específicas para nuestro colectivo tales como la Garantía de Gametos y Preembriones y la posibilidad de asegurar a las Sociedades Profesionales sin coste añadido

Llama ahora al 944 354 600 e infórmate

Teléfono exclusivo para asociadas y asociados comercializado por la Correduría de Seguros del Colegio de Médicos de Bizkaia

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



Hay un antes... a.Z. antes de Zürich. Te mejoran el precio de tus seguros

y un después d.Z. después de Zürich. Te mejoramos el precio de tus nuevos seguros y llévate hasta... 80€*

Estimada asociada o asociado, ¿has oído que siempre hay un antes y un después?

El momento de descubrirlo ha llegado de la mano de Zurich con una oferta que no te dejará indiferente.

Por pertenecer a ASEBIR te mejoramos el precio de tus nuevos seguros y además te llevas hasta 80€ de bienvenida* al contratar.

Vente a Zurich y empieza a ahorrar.

Infórmate



*La mejora de precio será de, hasta un 5% respecto al precio de renovación presentado a Zurich. Promoción válida para nuevas contrataciones realizadas entre el 1 de febrero y el 30 de junio de 2021 para pólizas de Auto, Moto, Hogar y Negocios. Adicionalmente el cliente recibirá hasta 80€ para nuevas contrataciones de los productos y en las condiciones que constan en las bases de esta promoción, realizadas entre el 1 de febrero y el 31 de diciembre de 2021. El abono de esta promoción se realizará a través de una transferencia bancaria al cliente en el plazo de 90 días desde la contratación y en la misma cuenta con la que hubiera realizado el pago. Con independencia del número total de pólizas nuevas contratadas y de la modalidad, el importe máximo a reintegrar a un mismo tomador (NIF) será 250€. Para ampliar el conocimiento sobre la mecánica, condiciones y promociones para otras modalidades/productos, consulta las bases en <http://colectivos.zurich.es/promocion2021>. Estos productos pertenecen a Zurich Insurance plc, Sucursal en España. Producto intermediado por SegurMec Correduría de Seguros, S.L. DGSFP J1281. El corredor recomienda estos productos sobre la base del análisis objetivo previsto en la Ley de Mediación de seguros y reaseguros privados.



XI CONGRESO ASEBIR



INFORMACIÓN

FECHAS

17, 18 y 19
de noviembre
de 2021

SEDE

Palacio de Congresos
El Greco,
Paseo Miradero,
s/n, 45003 Toledo

WEB

www.congresoasebir.es

CRÉDITOS

La acción formativa: XI CONGRESO ASEBIR TOLEDO 2021, con número de Registro: P-2021-14714, ha sido acreditada por la Comisión de Formación Continuada de las Profesiones Sanitarias de Castilla-La Mancha con 1,3 créditos.

Recomendamos consultar los REQUISITOS PARA LA OBTENCIÓN DE CRÉDITOS www.asebir.itchosting.es/creditos/

AUSPICIOS

Actividad auspiciada por la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) y la Sociedad Española de Contracepción (SEC)

SECRETARÍA TÉCNICA

GRUPO PROCESS, Betaprocess, S.L.
C/ Cronos, 20, Bloque 4, 1º, 6ª
Madrid 28037

Tel: +34 91 377 14 23

E-mail: info@congresoasebir.es

inscripciones@congresoasebir.es



XI CONGRESO ASEBIR

COMITÉS Y PREMIOS

COMITÉS

Presidente Comité Científico y Organizador Local:

Ramón José Suárez García

Vocales Comité Científico

Carmen Cañadas Gálvez
Minerva Ferrer Buitrago
Yosu Franco Iriarte
José Luis Girela López
Beatriz González López de Bustamante
Mª Victoria Hurtado de Mendoza Acosta
Miriam Iglesias Nuñez
Pere Mir Pardo
José Muñoz Ramírez
Iván Ochando Sánchez
María Sánchez Toledo
Miquel Solé Inarejos
Antonio Urries López
Xavier Vendrell Montón

Vocales Comité Organizador Local

Icía García Escribano
Rosa Ana Garrido Esteban
Mark Grossmann i Camps
Laura Herraiz Nicuesa
Bienvenida María Lozano Ruiz
Clara Isabel Luna Cañas
Laura Mifsud i Elena
Beatriz Rojas Ruiz
Laura Ruiz Rincón
Verónica Sáez Martínez

COMITÉ DE HONOR

Excmo. Sr. D. Emiliano García Page

Presidente de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha

Ilmo. Sr. D. Jesús Fernández Sanz

Consejero de Sanidad de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha

Excmo. y Magfco. Sr. José Julián Garde López-Brea

Rector de la UCLM

Dr. D. Vicente Carlos Silva Deustua

Jefe de servicio de Ginecología del Hospital Virgen de la Salud de Toledo

PREMIOS

Premio EMB-ASEBIR 2021

Las comunicaciones que, según la valoración del comité científico, se presenten en formato oral optarán al PREMIO EMB-ASEBIR 2021.

El premio estará dotado con diploma acreditativo y un premio en metálico de 5.000€ por gentileza del Grupo Equipos Médico-Biológicos.

El anuncio de la comunicación ganadora se hará el último día del Congreso, y la entrega del premio se realizará durante la Cena de Clausura por parte del Sr. Sergio Oliveró (Dir. Gral. Grupo EMB) y el Dr. Antonio Urries López (presidente de ASEBIR).

Premio a la Innovación MERCK ASEBIR 2021

El Premio, promovido por Merck, se otorgará a la comunicación científica que destaque por su carácter innovador en el ámbito de la biología de la Reproducción.

El premio estará dotado con 3.000 € y un diploma acreditativo que será entregado, el 18 de noviembre según programa, por el Dr. Antonio Urries López, presidente de ASEBIR y por un representante de Merck.

Premio ASEBIR al Mejor Póster 2021

Entre todas las comunicaciones que sean aceptadas en formato Póster, el Comité Científico del Congreso, elegirá las 6 mejores por su contenido y presentación.

Los seis finalistas harán la presentación de sus posters a pie de pantalla, para lo que dispondrán de 5 minutos cada uno. Serán informados antes del inicio del Congreso del día y hora de su exposición. Tras la exposición de los Posters, el Comité científico, decidirá el Mejor Poster 2021.

El ganador expondrá su trabajo en el Auditorio el viernes 19 de noviembre, según programa, para lo cual contará con 7 minutos para la exposición y 3 minutos para el turno de preguntas.

El premio será entregado, según programa, por el Dr. Antonio Urries López (presidente de ASEBIR) y estará dotado con diploma y 600 € para el ganador y diploma acreditativo para los 5 finalistas.

PROGRAMA CIENTÍFICO

MIÉRCOLES 17 DE NOVIEMBRE

10:00 - 11:00 h. Inauguración

11:00 - 12:30 h. **SESIÓN 1 - Investigación traslacional e Innovación en Reproducción Humana.**

11:00 - 11:45 h. Regulación de las técnicas de transferencia nuclear a nivel mundial.

Ponente: César Palacios González, The Oxford Uehiro Centre for Practical Ethics. Oxford University. Oxford – UK.

11:45 - 12:30 h. Genome editing in human embryos: latest results, prospects and translation to clinical practice.

Speaker: Shoukhrat Mitalipov, Center for Embryonic Cell and Gene Therapy. Oregon Health & Science University. Portland, Oregon – EEUU

12:30 - 13:30 h. **DEBATE**

El futuro del embriólogo clínico tras la automatización de los laboratorios.

Ponentes: Marcos Meseguer Escrivá, IVI Valencia, Valencia y Emilio Gómez Sánchez, TAHE Fertilidad, Murcia.

13:30 - 15:00 h. Comida

15:00 - 16:30 h. **SESIÓN 2 - Criobiología**

15:00 - 15:45 h. **Guía de recomendaciones sobre Criogenia.**

Ponente: Miquel Solé Inarejos, Institut Universitari DEXEUS, Barcelona.

15:45 - 16:30 h. Criopreservación de tejido ovárico.

Ponente: Christiani Andrade Amorín, UCLouvain (University of Louvain), Institut de recherche expérimentale et clinique, GYNE research group, Brussels, Belgium

16:30 - 17:15 h. **SIMPOSIO 1 - MERCK**

17:15 - 18:15 h. **Comunicaciones Criobiología**

18:15 - 20:00 h. **Cóctel Inaugural**

JUEVES 18 DE NOVIEMBRE

08:35 - 09:45 h. **SESIÓN 3 – Embriología 1**

08:35 - 09:10 h. Edición genética de embriones humanos para fines de investigación científica.

Ponente: Ana Veiga Lluch, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge. IDIBELL. L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona.

09:10 - 09:45 h. Developmental potential of aneuploid human embryos cultured beyond implantation.

Speaker: Marta Shahbazi, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK

09:45 - 10:45 h. **COMUNICACIONES EMBRIOLOGÍA 1**

10:45 - 11:05 h. **Pausa Café y exposición 3 Posters finalistas Premio Mejor Poster ASEBIR 2021**

11:05 - 12:15 h. **SESIÓN 3 - Embriología 2**

11:05 - 11:40 h. Las células madre en la medicina Reproductiva: ¿Están listas para el paciente?

Ponente: Cristina Eguizabal Argaiz, Centro Vasco de Transfusión y Tejidos Humanos (CVTTH), Galdakao, Bizkaia.

11:40 - 12:15 h. Estudio multicéntrico para la validación del criterio ASEBIR sobre la valoración morfológica de blastocistos.

Ponente: M Carme Pons Gatell, Institut Universitari DEXEUS, Barcelona.

12:15 - 13:05 h. **Comunicaciones Embriología 2**

13:05 - 13:50 h. **SIMPOSIO 2 - Coopersurgical**

13:50 - 15:15 h. Comida

15:15 - 16:45 h. **SESIÓN 4 - Andrología**

15:15 - 16:00 h. El RNA espermático: un campo emergente en la búsqueda de biomarcadores de fertilidad masculina.

Ponente: Joan Blanco Rodríguez, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.

16:00 - 16:45 h. Proteínas de membrana esenciales para la fecundación. Aplicación en microesferas y modelos tridimensionales.

Ponente: María Jiménez Movilla. Universidad de Murcia, Murcia.

16:45 - 17:30 h. **SIMPOSIO 3 – Grupo EMB**

17:30 - 17:50 h. **Pausa Café y exposición 3 Posters finalistas Premio Mejor Poster ASEBIR 2021**

17:50 - 18:50 h. **Comunicaciones Andrología 2**

18:50 - 19:05 h. **Exposición premio EMB-ASEBIR 2019: Blastocistos humanos procedentes de cigotos unipronucleares: un modelo biológico para el estudio de la ploidía, euploidía, topografía y parentalidad cromosómicas.**

Ponente: Xavier Vendrell Montón, Sistemas Genómicos, S.L., Paterna, Valencia.

VIERNES 19 DE NOVIEMBRE

08:30 - 10:00 h. **SESIÓN 5 - Genética**

08:30 - 09:15 h. Importancia del asesoramiento genético en Reproducción Asistida.

Ponente: Anna Abulí, Institut Universitari Dexeus, Barcelona.

09:15 - 10:00 h. Importancia del cribado poblacional en Reproducción Asistida.

Ponente: Julio Martín Rodríguez, IGENOMIX; Paterna, Valencia.

10:00 - 11:00 h. **Comunicaciones Genética**

11:00 - 11:30 h. **Pausa Café**

11:30 - 12:15 h. **SIMPOSIO 4 – Miltenyi Biotec**

12:15 - 13:45 h. **Asamblea General Ordinaria Socios ASEBIR**

13:45 - 15:15 h. Comida

15:15 - 16:45 h. **SESIÓN 6 - Calidad**

15:15 - 16:00 h. Planes de contingencia en las Unidades de Reproducción.

Ponente: Empar Ferrer i Robles, CREA (Centro Médico de Reproducción Asistida), Valencia.

16:00 - 16:45 h. Actualización de los RRHH, RRF y gestión de la calidad en el laboratorio.

Ponente: Carla Olmedo Illueca, Hospital General Universitario de Valencia, Valencia.

16:45 - 17:30 h. **SIMPOSIO 5**

17:30 - 17:50 h. **Pausa Café**

17:50 - 18:50 h. **Comunicaciones Calidad**

18:50 - 19:00 h. **Exposición Mejor Póster 2021**

19:00 - 19:15 h. **Cierre y Clausura del Congreso**

Cena de Clausura y Entrega del Premio "EMB-ASEBIR 2021"



XI CONGRESO ASEBIR

Nuestro agradecimiento a las casas comerciales sin cuya colaboración no sería posible realizar este evento.



PATROCINADORES PRINCIPALES



PATROCINADORES



Micropipetas



Aceites y medios



Vitrificación



Agujas de punción



Catéteres de transferencia

¿A qué esperas para conocer nuestros productos?

Kitazato-dibimed.com

**ASEBIR**

**CONCURSO
FOTOGRAFICO**

GANADORES 2021



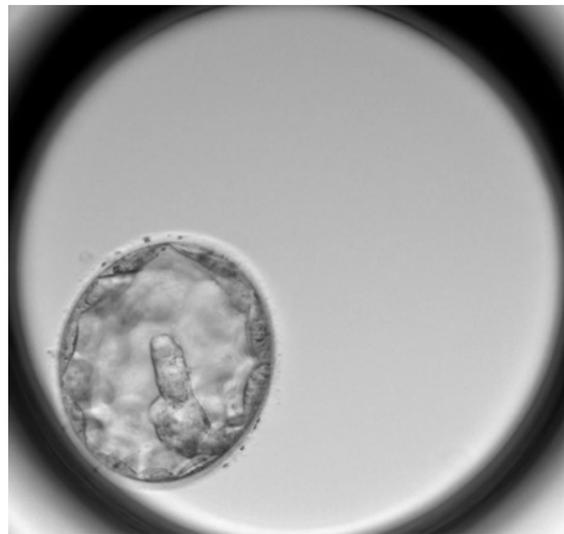
1^{ER} PREMIO

Título: Snowflake / Categoría: Criobiología
Autor: Irene Molina González / Socio ASEBIR: N° 766

Aquí os presentamos **las fotos ganadoras del III Concurso Fotográfico ASEBIR.**

*Irene Molina ha conseguido, con el 1º premio, una inscripción gratuita al **XI Congreso ASEBIR** que celebraremos en Toledo, del 17 al 19 de noviembre. María Fernández, con el 2º premio, ha ganado 200€ y Juan Manuel Moreno, con el 3º premio, 100€.*

Felicidades a los ganadores.



2º PREMIO

Título: ¿seXX or seXY? / Categoría: Embriología
Autor: María Fernández Díaz / Socio ASEBIR: N° 916



3^{ER} PREMIO

Título: Este trabajo es vida / Categoría: Embriología
Autor: Juan Manuel Moreno Moya / Socio ASEBIR: N° 1090

IMAGEN DE PORTADA

Logotipo del XI Congreso ASEBIR. Toledo 2021

IMAGEN DE CONTRAPORTADA

1^{er} Premio Concurso de Fotografía ASEBIR 2021

ASEBIR

Asociación para el Estudio
de la Biología de la Reproducción

Secretaría ASEBIR C/ Cronos, Nº 20, Bloque 4, 1 Piso, Nº 6 - 28037 Madrid
Tel +34 91 367 89 94 / www.asebir.com / asebir@asebir.com

