

# ASEBIR

Revista de Embriología Clínica  
y Biología de la Reproducción

DICIEMBRE  
2022

VOL. 27 Nº 2



IMAGEN: Alejandro Montoya Ureta, director del área clínica y científica de OVA IVF en Zurich (Suiza)

## SOCIOS POR EL MUNDO

Alejandro Montoya  
Ureta en Suiza

## CONOCIENDO A NUESTROS SOCIOS

Elena Perulli Espino cierra  
el círculo de la embriología

## ESTANCIAS FORMATIVAS

La experiencia de Ana  
Carbajo en Heidelberg

## PREMIO A LA INNOVACIÓN

MERCK-ASEBIR  
2021

## AULA JOVEN

- Potencial de la clonación
- Ovodonación: resultados en función de la técnica

## FORMACIÓN CONTINUADA

Principios básicos de  
criobiología

## NOTICIAS

- Asamblea de SOCIOS
- Congreso ASEBIR 2023

### EDITA

Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción

### EDITORES Y DIRECTORES CIENTÍFICOS

Laura Mifsud i Elena. Ginefiv, Barcelona  
Juan Manuel Moreno Moya. Aleris Fertilitet, Oslo, Noruega

### 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. IMI Sevilla, S.L., Sevilla

#### Grupos de Interés:

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

#### Docencia y Formación:

Antonio Alcaide Raya. REPROFIV, Madrid  
Cristina Camprubí Sánchez. GenIntegral, Reference  
Laboratory Genetics, UAB, Barcelona  
Miquel Sole Inarejos. Institut Universitari Dexeus, Barcelona  
Iván Ochando Sánchez. Complejo Hospitalario Universitario  
de Albacete, Albacete

#### Congresos:

Laura Mifsud i Elena. Ginefiv, Barcelona  
Beatriz González López De Bustamante. Clínica Nida, Vigo,  
Pontevedra  
María Fernández Díaz. Clínica Ergo, Gijón

#### Tecnología de la información y comunicación:

Juan Manuel Moreno Moya. Aleris Fertilitet, Oslo, Noruega

#### Publicaciones:

Laura Mifsud i Elena. Ginefiv, Barcelona  
Juan Manuel Moreno Moya. Aleris Fertilitet, Oslo, Noruega

#### 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

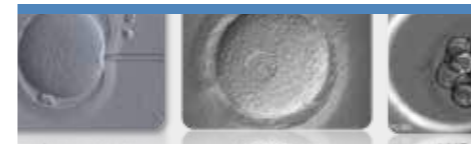
tiecomunicacion.es · comunicacion@tiecomunicacion.es

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*



## 04 EDITORIAL

## 06 SOCIOS POR EL MUNDO

Alejandro Montoya Ureta en Suiza

## 14 CONOCIENDO A NUESTROS SOCIOS

Elena Perulli cierra el círculo de la embriología

## 19 FORMACIÓN CONTINUADA

Principios básicos de criobiología

## 30 ESTANCIAS FORMATIVAS

La experiencia de Ana Carbajo en Heidelberg

## 34 PREMIO A LA INNOVACIÓN MERCK-ASEBIR 2021

## 43 AULA JOVEN

- Potencial de la clonación.
- Ovodonación: resultados en función de la técnica

## 61 NOTICIAS

- Asamblea de socios ASEBIR
- Congreso ASEBIR 2023

# EDITORIAL

▶ **ANTONIO URRIES LÓPEZ**  
Presidente de ASEBIR



## JENNIFER ANISTON: "EL BARCO HA ZARPADO"

El pasado 9 de noviembre, Jennifer Aniston, famosa protagonista de la serie televisiva "Friends", sorprendió publicando en una entrevista a la revista "Allure" que se había sometido a tratamientos de fertilidad y la frustración que le generó no conseguir el embarazo deseado.

Por encima del carácter sensacionalista de la noticia que se genera al tratarse de un personaje conocido, debería servirnos a todos los profesionales involucrados en este campo para reflexionar sobre dos puntos que quedan reflejados a lo largo de la entrevista. La falta de información que tiene la sociedad en general sobre su "biología reproductiva" y el riesgo que puede suponer el basar todo su proyecto reproductivo en "congelar unos óvulos"

Ambos puntos quedan reflejados en el artículo cuando la actriz, actualmente con 53 años, hace una revisión de todo lo sucedido en esos momentos y de cómo, incluso, tuvo que sufrir el ataque de la prensa que le tildaba de "egoísta" por hacer prevalecer (aparentemente) su carrera profesional frente a la maternidad, justo en una época en que se estaba sometiendo a todos esos fallidos tratamientos.

Creo que, sin duda, podemos ver reflejada esta situación en nuestra propia sociedad, pero sería un error y una injusticia responsabilizar a las mu-

eres por ello, como le pasó a Jennifer Aniston. La sociedad no se lo pone fácil. Y mucho menos a los más jóvenes. Competitividad laboral, condiciones imposibles de conciliación familiar, dificultad para independizarse... situaciones en las que toda la información sirve de poco. Como me dijo un día una colega y amiga "cuando estás al borde de la pobreza dan igual la educación, la biología de la reproducción y cualquier proyecto de futuro. Dan igual las ganas y los deseos".

Pero aunque no esté en nuestras manos revertir esta situación, en lo que sí debemos asumir responsabilidad es frente a esa falta de información. Debemos de ser capaces de transmitir a la sociedad mensajes más ajustados que den respuesta a esas dos cuestiones. Por algo nuestra asociación incluye las palabras "Estudio de la Biología de la Reproducción" y trabajamos para ese fin. No solo para hacer tratamientos de reproducción asistida.

Y ese es el llamamiento que os hago desde este editorial. Cada uno de nosotros, desde nuestras unidades, y de forma global a través de nuestra asociación, deberíamos afrontar la tarea divulgativa de explicar a la sociedad no solo cómo se hace una fecundación in vitro, sino también qué debe hacerse para no tener que acabar recurriendo a ella. Y si tienen que recurrir que sea en las mejores condiciones posibles.

## EDITORIAL

### JENNIFER ANISTON: "EL BARCO HA ZARPADO"

Está claro que tal como ha evolucionado la sociedad es difícil que volvamos a la situación de hace 50 años, cuando la edad media de embarazo apenas pasaban de los 20, pero la sociedad debe, por lo menos, ser consciente de los riesgos que corre si retrasa demasiado su maternidad y de las posibles opciones a las que puede recurrir si ve claro que ese retraso es inevitable.

Incluyendo naturalmente la criopreservación de óvulos. Pero no como "la opción" sino como "una opción cuando no hay otra opción" y nunca con el mensaje de que esa preservación le va a garantizar su futuro embarazo.

Siempre he pensado que debemos considerarnos profesionales de la reproducción, no solo de la reproducción asistida, y ayudar a informar a la sociedad de que la vida es muy larga, pero la vida reproductiva no lo es tanto y no podemos

permitir que acaben viniendo a nuestras consultas mujeres de más de 40 años que se sorprendan de que su maternidad está en peligro porque nadie les había avisado. Pero también deben saber que congelar unos óvulos no les va a garantizar ser madres en el futuro.

Desde ASEBIR os animamos a que asumáis esa responsabilidad en vuestros centros y promováis campañas divulgativas sobre la Biología de la Reproducción. Y sobre todo ayudar a las mujeres jóvenes (y sus parejas) a valorar su proyecto reproductivo y a la toma de decisiones cuando aún están a tiempo. No deberíamos permitirnos que, ni Jennifer Aniston ni nadie, dijera frases como la publicada en su reportaje: "ojalá alguien me lo hubiera dicho antes".

Luego, si es necesario, ya les explicaremos cómo se hace una preservación de óvulos o una fecundación in vitro.





► ENTREVISTA

Para esta edición tenemos el placer de desplazarnos hasta Suiza, a la ciudad de Zúrich, de la mano de nuestro socio Alejandro Montoya Ureta, que nos adentrará en el país que le ha acogido en estos últimos años.

Y sin más dilación, vamos conocer a Alejandro para que nos meta de lleno en la 'aventura Suiza' y nos muestre todos los secretos de nuestra profesión en ese país.

**ASEBIR:** Bienvenido, Alejandro, a nuestro espacio de entrevistas, ¡estamos encantados de tenerte con nosotros!

**ALEJANDRO MONTOYA:** Muchas gracias a vosotros y permíteme en primer lugar, agradecer que me hayáis dado la oportunidad de participar en este espacio y por ayudar a divulgar cómo se vive la embriología más allá de nuestras fronteras.

**ASEBIR:** Os lo agradecemos a vosotros por abrirnos las puertas del mundo en cada edición,... Permitamos a nuestros lectores que conozcan quién nos trae de la mano un país tan maravilloso como el que vienes a relatarnos...

**ALEJANDRO:** ¡Claro! Antes de nada, mejor presentarme. Soy Alejandro Montoya, alicantino criado en Madrid, socio de ASEBIR nº1040. Me licencié en Biología en la Universidad de Alicante y posteriormente me especialicé en Fertilidad y Reproducción Asistida realizando un Máster en La Fe (Valencia). Pasados unos años comencé a interesarme el mundo de los negocios, por lo que realicé un MBA con especialización en el sector de la Salud.

**ASEBIR:** Uau, qué gran recorrido...

**ALEJANDRO:** Sí, como todo en la vida, con mucho esfuerzo, pero merece la pena siempre...

**ASEBIR:** Pero has ido muy rápido, ¿cómo llegaste ahí, Alejandro?

**ALEJANDRO:** ¡Jaja! Pues, si me dejas, te cuento desde el principio... al terminar la carrera, los campos que más interés me despertaban eran la Inmunología y la Genética. Sin embargo, en el último momento me ofrecieron la posibilidad de realizar las prácticas de final de carrera en una pequeña clínica de fertilidad de Elche llamada ICSI. En un principio no entraba en mis planes, pero indagando e investigando un poco me picó la curiosidad y decidí apostar por ello.

**ASEBIR:** Esas pequeñas experiencias que nos llegan a cambiar la vida...

**ALEJANDRO:** Efectivamente,... de hecho, durante mi estancia allí, comencé a interesarme y adentrarme en el mundo de la Medicina Reproductiva. Y fue allí donde me surgió la posibilidad de realizar el Master en Fertilidad al que posteriormente me inscribiría y realizaría. Y, aunque ahora suene inusual, antes de terminar el Máster me contactaron de una clínica de Fertilidad para comenzar a trabajar con ellos. Desde entonces y casi sin darme cuenta, ¡mi vida profesional ha ido ligada a este campo! En resumen, ¡casi diría que fue el mundo de la Fertilidad el que me encontró a mí!

**ASEBIR:** Y nos ha encontrado a muchos de nosotros... ¿Y hasta llegar a Zúrich, algo más que destacar?

**ALEJANDRO:** Profundizando un poco, en mis últimos meses en Valencia, realizando el Master en Reproducción Asistida, me surgió la posibilidad de unirme al equipo del Instituto Bernabéu de Alicante, donde completé mi formación y tuve mi primer contacto con el mundo laboral, además de conocer a estupendos profesionales y compañeros. También estuve ligado al mundo de la investigación, colaborando durante unos años en un proyecto para el CSIC. Mi vuelta a la actividad

clínica fue de la mano de IVF Spain, donde terminé de desarrollarme como embriólogo y empezaron a despertarse otras inquietudes en mí. Fruto de ello, compaginé mi actividad laboral con la realización de un MBA con especialización en el sector Healthcare, lo cual me proporcionó una visión más amplia sobre nuestro sector, no solo desde el punto de vista clínico y científico, sino también desde su vertiente empresarial. He de resaltar que durante esta etapa, también tuve la suerte de disfrutar de un excepcional equipo humano y profesional.

El siguiente capítulo de la historia ya fue mi aterrizaje en Zúrich, Suiza, donde actualmente vivo y trabajo, dirigiendo el área clínica y científica en OVA IVF. Además, aprovecho para seguir formándome en diferentes áreas, así como para realizar distintas actividades de consultoría y apoyo para diversas start ups del sector de la fertilidad.





**ASEBIR:** ¿Y cómo llegó esa oportunidad, de trabajar en Zúrich?

**ALEJANDRO:** En este caso, tras la consecución del MBA, se me abrió la posibilidad de vivir una experiencia internacional dirigiendo un equipo en Zúrich. Siempre había tenido el gusanillo de vivir y trabajar fuera y, aunque al principio le dediqué tiempo a tomar la decisión, finalmente me decidí a vivir la experiencia tanto personal como profesional.

**ASEBIR:** E imaginamos que aunque había ganas de vivir fuera, siempre cuesta, ¿no?

**ALEJANDRO:** Pues fíjate, que aunque dicen que los comienzos siempre son difíciles, y más si el comienzo implica cambio de trabajo, de país, de lengua y de cultura... he de decir que me considero bastante afortunado del lugar al que fui a parar. Mi adaptación al nuevo entorno laboral en OVA IVF fue bastante rápida y sencilla. Tengo que puntualizar que, una vez más, tuve muchísima suerte con el equipo humano con el que he podido convivir durante estos años, lo cual me hizo el inicio y la adaptación mucho más fácil.

**ASEBIR:** Siempre algo fundamental cuando entras en un trabajo, el equipo humano que te acompañará cada día en nuestra segunda casa...

**ALEJANDRO:** ¡Es que pasamos un tercio de nuestro día ahí! Es importante, por supuesto.

**ASEBIR:** ¿Y qué panorama encontraste a nivel profesional?

**ALEJANDRO:** Pues en el momento de mi llegada a Suiza, allá por principios de 2015, el país encaraba un cambio de legislación importante en materia de reproducción asistida.

**ASEBIR:** Como iría haciendo falta en España...

**ALEJANDRO:** Efectivamente, aunque en este caso el punto de partida se localizaba en ¡las antípodas! ... de hecho, hasta entonces la ley en este campo había sido muy restrictiva, bastante parecida a la alemana, pero después de mucho esfuerzo e insistencia por parte de las asociaciones de fertilidad en Suiza, el panorama legislativo estaba a punto de cambiar. Eso, además de numerosas nuevas opciones, implicaba un no menor número de retos.

**ASEBIR:** Cuando la legislación se modifica, se avecinan muchos cambios y adaptaciones...

**ALEJANDRO:** Y éste es uno de los principales motivos en los que consistió uno de mis primeros proyectos en tierras helvéticas, el de adecuar todos los procesos e infraestructuras a la nueva realidad legislativa que se iba a aprobar, además de modernizar los laboratorios tanto de IVF como de Andrología. Ello implicó el cambio de protocolos normalizados de trabajo, la introducción de nuevas técnicas, la implantación de un nuevo sistema de control de calidad, una importante transferencia de knowhow, la formación del personal en los nuevos procedimientos y técnicas establecidas, etc...

**ASEBIR:** Cuéntanos un poco más sobre la legislación en Suiza y sobre los cambios que acontecieron... ¡somos todo oídos!

**ALEJANDRO:** ¡Vamos a ello! A mi llegada al país, me encontré con un panorama bastante diferente a lo que había visto hasta entonces en el campo de la fertilidad. El viejo marco legislativo era bastante restrictivo, de manera que el cultivo embrionario solo estaba permitido para los embriones que se iban a transferir, no estando permitido en ningún caso cultivar más de tres. De forma que en día 1, en pronúcleos, se tenía que decidir que cigotos se dejaban en cultivo para posteriormente transferirse, normalmente en día 2 o día 3, y congelar el resto en día 1, estadio de PN.

**ASEBIR:** Bastante similar a lo que nos contaba Victoria de Alemania... ¿y el resto se vitrificaban?

**ALEJANDRO:** Aquí viene otro punto curioso; en el momento en el que llegué, en la clínica se realizaba congelación lenta por motivos de logística, técnica que solo había visto durante las prácticas de empresa que realicé. La criopreservación de

embriones solo estaba permitida en casos de urgencia, como que la paciente estuviese hiperestimulada en el momento de la transferencia. Además, técnicas como el PGT o la donación de ovocitos o embriones no estaban permitidas. Tampoco existía el requisito legislativo de que los centros tuviesen implementado un sistema para control de la calidad como tal.

**ASEBIR:** Madre mía... muchos de los embriólogos de este país no habrán visto nunca la congelación lenta... ¿y se podía preservar la fertilidad?

**ALEJANDRO:** En este sentido, la preservación de la fertilidad (óvulos y espermatozoides) sí estaba permitida, pero no podían superar los cinco años de almacenamiento (salvo bajo causa médica justificada), por lo que no había muchos pacientes interesados en llevar a cabo esta opción en Suiza, por lo general se iban a otros países con una legislación más permisiva en este aspecto. Este punto cambió con la nueva ley, ampliándose la posibilidad de almacenar gametos criopreservados hasta los 10 años posteriores a su congelación.

**ASEBIR:** ¿Y qué más cosas contempla la nueva ley?

**ALEJANDRO:** Pues como iba contando, finalmente en 2017 fue aprobada y empezamos a implementar todos los cambios programados y preparados. La nueva ley permitía el cultivo embrionario hasta blastocisto de hasta 12 embriones (se estableció este número como compromiso, para prevenir una elevada generación de embriones) así como su vitrificación.

**ASEBIR:** Mucho mejor en todos los aspectos, mayores garantías y mejores resultados seguro...

**ALEJANDRO:** En efecto... Y también a partir de ese momento se aprobó el uso del PGT de una manera bastante liberal, no con las restricciones para el uso de esta técnica que tienen otros países europeos como Francia y Alemania.

**ASEBIR:** Y, ¿mejoró en temas de calidad?

**ALEJANDRO:** Totalmente, se regularizó y pasó a ser obligatorio por ley el contar con un sistema de gestión y control de la calidad así como contar con un jefe de laboratorio que estuviese en posesión del título Senior de la ESHRE.

**ASEBIR:** Buen cambio, aunque debería ser válido también el de ASEBIR, (guiño, guiño).

**ALEJANDRO:** Debería, debería...

**ASEBIR:** Y en otros campos, ¿qué más destacarías?

**ALEJANDRO:** En realidad fueron muchos los cambios realizados: se aprobó la realización de ciclos para parejas del mismo sexo (estableciendo como requisito que tienen que estar casadas). La donación de semen seguía estando aprobada, como ya lo estaba en la antigua ley, sin embargo la donación de óvulos sigue sin estar aprobada tras el cambio de ley, aspecto el cual resulta bastante chocante. De la misma manera, la gestación subrogada y los ciclos para mujeres solteras siguen sin estar permitidos bajo el nuevo marco legislativo.

**ASEBIR:** Vaya, eso sí que sorprende... se podría entender la gestación subrogada, pero ni donación de ovocitos, ni mujeres solas... llama la atención.

**ALEJANDRO:** La verdad es que sí... mucho. Y volviendo a la donación de gametos (ya hemos visto que, a día de hoy, solo está permitida la de espermatozoides), la legislación previa al año 2001 establecía la donación de semen como anónimo, sin embargo, a partir de dicho año cambió, pudiendo aquellos niños nacidos de semen de donante, una vez cumplidos los 18 años, conocer la identidad de su padre biológico. Esta parte de la ley continúa vigente actualmente.

**ASEBIR:** Tema de gran debate sobre la mesa, el anonimato en las donaciones...

**ALEJANDRO:** Sí, es un tema bastante candente. Y en este caso, a diferencia de España, los niños nacidos procedentes de donaciones de esperma puede ser de un máximo de ocho niños por donante y se realiza un estricto registro y control anual a nivel estatal tanto de los donantes como de los nacidos de los donantes. Puntualizar en este apartado que OVA IVF cuenta con el mayor banco de semen de donante a nivel nacional.



**ASEBIR:** Es decir, a modo de resumen respecto a la legislación española tendríamos...

**ALEJANDRO:** Pues básicamente, en comparación con la ley española, las principales diferencias serían: la restricción de no poder cultivar más de 12 embriones, así como la prohibición de la donación de óvulos, la falta de acceso a estos tratamientos para mujeres solteras y el límite de 10 años para la criopreservación de gametos y embriones.

**ASEBIR:** Y qué panorama reproductivo tenemos en Suiza a nivel de clínicas, tratamientos, etc...

**ALEJANDRO:** Pues actualmente en Suiza hay unas 33 clínicas con licencia. Tan solo 7 de ellas son públicas. La media anual de ciclos realizados a nivel nacional oscila aproximadamente entre los 9.000 y los 11.000, entre ciclos frescos y congelados. De ellos, OVA IVF realiza aproximadamente unos 700 al año. En cuanto a la capitalización anual del sector, ronda entre los 40 - 50 millones.

**ASEBIR:** ¡Que se dice pronto! Y a nivel de financiación en la sanidad pública, precios en la privada... ¡sorprendenos!

**ALEJANDRO:** A este respecto podemos destacar dos curiosidades: Suiza es uno de los pocos países europeos en los que el seguro de salud no cubre el tratamiento de fertilidad, estando tomado en su práctica totalidad por el sector privado. Este hecho, a pesar del saludable estado financiero de sus habitantes, influye en el número de tratamientos a nivel nacional, siendo menor que en otros países de su entorno.

Y el otro dato que llama la atención, por el que además me preguntas, es el del precio de los tratamientos. En comparación con el nivel de vida (el coste de la vida es aproximadamente tres veces más caro que en España), el precio de los tratamientos es sorprendentemente bajo; se sitúan en el mismo rango que en nuestro país.

**ASEBIR:** Ostras, qué curioso... eso sí que llama la atención. Y el tema que últimamente está dando qué hablar, ¿situación laboral de los embriólogos?

**ALEJANDRO:** ¡Ay, qué tema tan actual y polémico! Pues aquí, con respecto a la embriología, tampoco existe una especialidad como tal en el campo, es por ello por lo que principalmente necesitan buscar a los profesionales con este perfil fuera de sus fronteras. El embriólogo español tiene muy buen nombre y mercado en Suiza...

**ASEBIR:** Sí, porque aunque no tengamos tampoco la especialidad como tal, estamos muy especializados y preparados...

**ALEJANDRO:** Efectivamente, eso es un hecho que nadie puede negar.

**ASEBIR:** Y cuéntanos un poco más de tu centro y tu trabajo allí...

**ALEJANDRO:** En este sentido, lo que inicialmente empezó siendo un proyecto de transferencia de knowhow y adaptación a una nueva realidad legislativa, ha ido evolucionando hasta convertirse en otro proyecto para situar a OVA IVF en la vanguardia del mercado suizo en términos de calidad asistencial, innovación y tasas de éxito, donde actualmente se sitúa. Además de trabajar también la parcela del marketing dando difusión a nuestro trabajo y a la filosofía de la clínica.

Comenzamos siendo la primera clínica en toda Suiza en introducir la tecnología TL, a lo que le siguió un trabajo en el desarrollo y creación de algoritmos para una mejor predicción de las tasas de éxito. Me ocupé de redactar de nuevo todos los PNT consiguiendo una mayor eficiencia en el trabajo y una reducción de costes asociada. Implementamos desde cero un nuevo sistema para la gestión y el control de la calidad el cual nos ayudó a pasar exitosamente las diferentes auditorías a las que nos hemos ido sometiendo durante estos años y así obtener la licencia para poder desarrollar nuestra labor en el marco de la nueva ley.



**ASEBIR:** La calidad, esa a veces gran olvidada y que tan y tan importante y necesaria es...

**ALEJANDRO:** Ya no se concibe la reproducción sin la calidad, eso ya no lo duda nadie... De hecho, en mi caso, fruto de ese trabajo, entré a formar parte del Comité de Acreditación Suizo para la calidad de laboratorios IVF (QUARTS).

**ASEBIR:** ¡Enhorabuena!

**ALEJANDRO:** ¡Gracias! También comenzamos desde cero a realizar PGT, me encargué de seleccionar y formar a nuevo personal y he tenido la posibilidad de asistir a diferentes congresos internacionales así como de dar ponencias para compañías farmacéuticas.

Como comentaba antes, considero que he tenido muchísima suerte con el equipo humano de OVA IVF. Son unos grandes profesionales con los que realmente da gusto trabajar. Muestra de ello es que la duración inicial del proyecto iba a ser de dos años y ya llevo siete y medio por estas tierras...

**ASEBIR:** ¡Genial! Y esperemos que muchos más... Y sobre la clínica, ¿cuántas personas estáis trabajando ahora mismo?

**ALEJANDRO:** El equipo no es muy grande, somos unas 15 personas en total. El equipo de laboratorio está formado por dos biólogos y una técnico que se encarga del laboratorio de andrología. La bióloga que está conmigo en el laboratorio de IVF es mi compañera Patricia Peinado de Alicante, a la cual formé desde cero. A día de hoy sabe realizar todas las técnicas a la perfección. Tanto es así, que entre los tres conseguimos sacar los aproximadamente 700 ciclos que realizamos anualmente.

**ASEBIR:** ¡Vaya! Y, ¿cuál es vuestro secreto?

**ALEJANDRO:** Bien es cierto que la planificación y mentalidad suiza nos ayuda a trabajar con una muy elevada eficiencia; con mucho orden, con los bloques y procesos muy definidos y prácticamente sin tiempos muertos.

**ASEBIR:** Y, ¿qué puedes decirnos del perfil de pacientes?

**ALEJANDRO:** Con respecto al tipo de paciente mayoritario que atendemos en nuestra clínica, sobre todo son residentes en Suiza y la principal característica diría que es la edad materna avanzada (unos 37.5 de media). En cuanto al factor masculino, no se aprecian diferencias significativas con los pacientes que se tratan en España.



**ASEBIR:** Y técnicamente, ¿alguna cosa a destacar?

**ALEJANDRO:** Pues en cuanto al trabajo en sí, hay poca diferencia con el que se realiza en España, y por lo que he leído en pasadas ediciones de la revista, parece ser así en la mayor parte del mundo. Los medios, equipos, casas comerciales... son las mismas ya conocidas por todos.

**ASEBIR:** Y por si algún socio que nos esté leyendo quisiera pasar una temporada en Suiza, ¿qué puedes contarnos del país?

**ALEJANDRO:** Que lo peor es lo de cenar a las 18h... no me acostumbro... jejeje

No, en serio, cualquiera que sale de su país (y de su zona de confort) sabe que adaptarse a un nuevo entorno, cultura, idioma... conlleva su tiempo y su esfuerzo. Sin embargo, a pesar de que el paso de una sociedad de carácter mediterráneo a una más fría y distante es notorio, no es menos cierto que el hecho de que Zúrich tenga cerca de un 40% de población procedente de otros países al igual que la facilidad de prácticamente la totalidad de sus habitantes para hablar un perfecto 'business ingles' además de 2 o tres lenguas adicionales... ayuda bastante en las etapas iniciales. ¡Especialmente cuando te adentras en esta aventura sin tener ni idea de alemán!

**ASEBIR:** Esto nos quiere sonar, jajaja.

**ALEJANDRO:** Pero tengo que destacar, que vivir y trabajar en Suiza es una experiencia muy pero que muy recomendable. De hecho, te podría dedicar un artículo por separado solo para este apartado.

## SOCIOS POR EL MUNDO · SUIZA

ALEJANDRO MONTOYA URETA

Por un lado, bien es sabido por todos la diferencia entre las condiciones laborales en el norte de Europa con respecto a las nuestras en términos de certidumbre, flexibilidad, equilibrio entre vida personal y laboral, así como en términos retributivos. Vivir la experiencia de trabajar aquí es algo que realmente recomiendo. El 'precio' a pagar es obviamente el de estar lejos de los tuyos.

**ASEBIR: Algo muy a tener en cuenta, España no es que sea un país agradecido en ese sentido, en general...**

**ALEJANDRO:** Ya... en eso deja un poco que desear nuestra querida España.

Por otro lado, es un país en el que todo funciona como debería en prácticamente todos los ámbitos y todo está cuidado hasta el más mínimo detalle, proporcionando realmente una muy buena calidad de vida, de hecho, casi todos los rankings lo sitúan en las primeras posiciones a este respecto. El coste de la vida es muy elevado (como unas tres veces lo que cuestan las cosas en España) pero los salarios van acorde. En cuanto al tiempo libre, este país te ofrece multitud de actividades de ocio en las distintas estaciones del año; naturaleza, montaña, deportes acuáticos, mercadillos de navidad, esquiar en los Alpes... además de que todos los paisajes parecen salidos de un cuento de hadas. Por no mencionar la facilidad para viajar y moverte al estar en el centro de Europa y brindarte tiempo y recursos para ello.

**ASEBIR: Ay, ¡nos están entrando ganas de irnos contigo!**

**ALEJANDRO:** ¡Para nada os arrepentiríais!

**ASEBIR: Y la pregunta del millón, ya para acabar, Alejandro... ¿volver a España?**

**ALEJANDRO:** Veo que esta es una pregunta recurrente en las distintas entrevistas a la gente que estamos trabajando fuera. Sin duda, por mucho que te adaptes, siempre vas a echar de menos una serie de cosas como son tu familia, amigos, tu lengua, tu tierra...

Por otro lado, el estilo de vida y las condiciones laborales en Suiza te permiten tener bastante flexibilidad (más aún en muchos sectores después de la pandemia y la normalización del trabajo a distancia), por lo que tienes relativa facilidad para llevar un 'worklife balance' adecuado e incluso volver con frecuencia a casa siempre que necesites 'huir' del invierno suizo y cargar pilas con los tuyos.

**ASEBIR:** Pues aquí siempre serás bienvenido, y quién sabe, igual alguno de nuestros socios te pide consejo para visitarte... Muchas gracias por todo tu tiempo y amabilidad, Alejandro, ha sido un verdadero placer tenerte con nosotros en este espacio, acercándonos a ese maravilloso país del que nos has hecho partícipes. GRACIAS.

**ALEJANDRO:** Muchas gracias a vosotros nuevamente por darnos esta oportunidad y como mis anteriores compañeros, os animo a enviar vuestra solicitud para participar si estás en un país fuera de España, ¡gracias por todo!

**ASEBIR:** Ya habéis oído, si estás trabajando fuera de España y quieres contarnos tu situación, escribe un correo a [asebir@asebir.com](mailto:asebir@asebir.com) y nos pondremos en contacto contigo en la mayor brevedad posible. Gracias por siempre, Alejandro.



*Si deseáis participar en esta sección solo debéis escribirnos un mensaje a la Secretaría de ASEBIR en el correo [asebir@asebir.com](mailto: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!*

# KITAZATO®

Las Mejores Prácticas en **Vitrificación**

## EL MÉTODO CRYOTOP®

Gold Standard en vitrificación con las mayores tasas de supervivencia, enfriamiento y calentamiento del mercado.



Las Mejores Prácticas en **Micromanipulación**

## MICROPIPETAS

Esterilizadas y etiquetadas de manera individual para garantizar la más alta seguridad.



Las Mejores Prácticas en **Punción Ovárica**

## AGUJAS DE PUNCIÓN OVÁRICA

Diseño *Thin Wall* para asegurar el menor trauma para el ovocito y la paciente.



Las Mejores Prácticas en **Transferencia Embrionaria**

## CATÉTER PRECURVADO

Máximo control, visibilidad y suavidad para asegurar la comodidad de la paciente.

Las Mejores Prácticas en **Cultivo**

## HYPURE™ OIL DENSO

Las mejores tasas de desarrollo embrionario y de recuento celular en cultivo prolongado en incubador seco.



## DE EMBRIÓN FIV A EMBRIÓLOGA



ELENA

PERULLI ESPINO

### ► ENTREVISTA

Para esta edición de la revista ASEBIR contamos con una socia que ha cerrado el círculo, si se puede hacer este símil, convirtiéndose en una profesional dedicada a aquello que le dio la vida... el laboratorio de fecundación in vitro.

Elena Perulli Espino es nuestra invitada que viene a contarnos como un bebé FIV se convirtió en toda una embrióloga con ganas de llegar a lo más alto.

ASEBIR: ¡Bienvenida Elena!

Elena Perulli: ¡Muchas gracias, Laura! Es un verdadero placer para mí poder estar aquí contando mi historia y agradecer esta oportunidad.

ASEBIR: El placer es nuestro, Elena. Pero permite a nuestros lectores que sepamos quién nos está hablando, ¿a quién tenemos el placer de estar entrevistando en esta ocasión?

Elena: ¡Claro! Pues mi nombre es Elena Perulli Espino, socia número 1785, italoespañola y una bebe FIV convertida en embrióloga.

ASEBIR: Vaya, mitad italiana, mitad española... ¿Y dónde naciste, Elena?

ELENA PERULLI ESPINO

**Elena:** Nací en la isla maravillosa de Lanzarote, de donde es mi madre y lugar donde se conocieron y enamoraron mis padres, aunque realmente fui concebida 10 años después en el laboratorio de FIV del Hospital Universitario de Tenerife.

**ASEBIR:** Genial, Elena, pues ahora que ya sabemos un poco más de ti, entremos en materia, ¿cómo te enteraste que eras un bebé FIV?

**Elena:** Fíjate que realmente en mi casa el tema de la reproducción asistida nunca fue un tabú. De hecho, recuerdo ser muy muy pequeñita y mi madre contarme que "papá y mamá necesitaron ayuda para tener hijos y que fueron a una clínica donde pusieron semillitas dentro del ombligo de mamá" para tenernos a nosotros, a mi hermano mellizo y a mí. Además, mis padres nunca lo ocultaron fuera de casa, estaban tan encantados de por fin haber conseguido su sueño, que no fue un secreto para nadie.

**ASEBIR:** Para hacer tanto años, que no fuera un tabú podría decirse que es todo un logro... Y ¿cómo lo vivisteis?

**Elena:** La verdad es que como desde pequeñita, los aproximadamente 10 años de lucha que tuvieron mis padres hace 24 años para cumplir su sueño de formar una familia, fue un tema muy normalizado y conversado en casa, yo no era consciente de que haber nacido gracias a la reproducción asistida pudiese llevar una connotación negativa para ciertas personas.

**ASEBIR:** Eso es muy importante, y más teniendo en cuenta que si ahora aún es considerado como un tabú, hace tantos años, aún lo era mucho más...

**Elena:** Pues sí, yo creo que lo mejor fue que desde el principio en nuestra casa nunca fue un secreto y mi hermano gemelo y yo lo llevamos siempre con mucho orgullo. Al final del día... ¿Cuántos niños podían presumir de haber estado sumergidos en nitrógeno líquido? ¡Eso era todo un logro!

**ASEBIR:** Guau, la verdad es que ahora hay más, pero que lo sepan y de hace tantos años, ¡puede decirse que es toda una hazaña! ¡Que aún estaba la congelación lenta!

**Elena:** ¡Sí! En el caso de nuestra FIV, a la segunda fue la vencedora. Por lo que me han contado mis padres, antes los pacientes no obtenían apenas información sobre el ciclo, de hecho desconocen nuestras calidades. Yo en mis sueños soy un blastocisto iniciando hatching AA aunque seguramente me congelaran en día 3 pero oye, soñar es gratis... Ojos que no ven, corazón que no siente jajaja.



**Elena:** Lo que sí saben es que fue un ciclo freeze-all donde de 13 óvulos llegaron a congelar 8. Realizaron una primera transferencia de 4 que no resultó en beta positiva, y a la segunda transferencia de los otros 4 nos quedamos mi hermano y yo.

**ASEBIR:** ¡Madre mía, cuatro embriones, eso ahora es impensable! ¡E ilegal!

**Elena:** ¡Sí lo es, sí! ... ahora sería una locura, pero sabemos que esto era el pan nuestro de cada día en aquel entonces...

**ASEBIR:** Y ¿cómo esta bebé FIV ha llegado a ser la Elena que ahora nos cuenta su historia?

**Elena:** Ay, pues a los 17 años hice las maletas y puse rumbo desde la pequeña isleta canaria que me vio crecer, a la península. Concretamente me mudé a Reus, provincia de Tarragona donde me gradué del Grado de Bioquímica y Biología Molecular.

**ASEBIR:** Y ¿elegiste esta carrera sabiendo ya que querías ser embrióloga, o surgió después de iniciar los estudios superiores?

**Elena:** Yo siempre he sido una apasionada de la biología humana. De hecho iba a entrar en Medicina hasta que el último día antes de hacer la matrícula decidí cambiarme a Bioquímica sin tener un enfoque claro. Además, en el grado aprendí tantas cosas sobre ámbitos tan diferentes de la biología que realmente salí de la Universidad súper perdida. La mejor decisión



## CONOCIENDO A NUESTROS SOCIOS

ELENA PERULLI ESPINO



fue tomarme un año sabático para trabajar y decidir a qué me quería dedicar porque, por casualidades de la vida, durante el confinamiento me aparecieron publicidades de Webinars que organizaba IVI de manera online y gratuita y fue en ese momento donde se conectaron los cables y por fin se encendió mi pasión por la embriología.

**ASEBIR:** Esa pandemia que tantas huellas a dejado en nosotros, ¡aunque en tu caso parece que muy bueno!

**Elena:** ¡Ni que lo digas! Esa pandemia que a cada uno le ha tocado vivir como ha podido... Después volví a hacer las maletas para realizar el Máster de Biología Molecular y Biomedicina en Bilbao. Fue en esta ciudad donde se me abren las puertas de la reproducción asistida, ya que realicé prácticas en el segundo semestre en el Instituto iGin, clínica ginecológica y de reproducción asistida. Instantáneamente siento como si se hubiera cerrado el círculo. Veía la historia de mi familia reflejada en tantas pacientes, pero esta vez desde el otro lado, desde el laboratorio de FIV, donde con mis propias manos tenía la capacidad de crear vida y formar parte del maravilloso momento en el que sus sueños se convertían en realidad.

**ASEBIR:** Una sensación maravillosa cuando eso ocurre...

**Elena:** Totalmente... Es espectacular... Y aquí, con esa sensación tan buena, mis prácticas llegaban a su fin, y comenzó a cundir el pánico. Por fin había encontrado el trabajo de mis sueños, mi vocación en la vida, pero cada vez veía más cerca el final de mi estancia ahí y mi mente se inundó de dudas. ¿Y si nadie me da la oportunidad de formarme como embrióloga? ¿Y si nadie cree en mí?

**ASEBIR:** Estas dudas que son compartidas por prácticamente el 100% de las personas que nos dedicamos a esta profesión...

**Elena:** Sí, ¡y dan tanto vértigo! Pero no podía rendirme, y empecé a enviar decenas de curriculums a todas las clínicas del país. Me daba igual en qué ciudad acabara, mientras que fuera en una clínica que creyera en mí.

**ASEBIR:** Está claro que después de pasar por varias ciudades, lo que menos importaba era el lugar...

**Elena:** Y mira qué casualidad de la vida, la única clínica en responder a la novatilla fue Procrear, clínica ginecológica y de reproducción asistida ubicada en Reus. Sin tan siquiera haber defendido la tesis de Máster, cogí un vuelo y, con toda la ilusión del mundo, vine a hacer la entrevista. Al día siguiente ya empecé mi aventura como embrióloga en formación, hasta día de hoy donde, un año y medio después siguen apostando por mí.

**ASEBIR:** Y ahora sí, de verdad, se curva una línea recta para formar un círculo, precioso, por cierto...

**Elena:** Sí, sí que lo es. Y tanto me gusta lo que hago, que actualmente compagino mi jornada laboral en la clínica con mi Instagram @elenaperulli dedicado a la divulgación, asesoramiento y acompañamiento donde tengo la suerte de poder disfrutar de mi pasión en mi tiempo libre.



## CONOCIENDO A NUESTROS SOCIOS

ELENA PERULLI ESPINO

**ASEBIR:** Se podría decir que inviertes la mayor parte del tiempo a la embriología,...

**Elena:** Efectivamente... me escriben muchas mujeres a diario buscando a una profesional externa a su clínica que les aporte tiempo, conocimientos y apoyo emocional. Me siento increíblemente realizada cuando interactúo con ellas porque, en gran parte, este proyecto surge del pensamiento empático de ponerme en el lugar de mis padres que una vez fueron pacientes...

**ASEBIR:** En un camino demasiado duro a veces...

**Elena:** ¡Exacto! Y me hubiera encantado que ellos hubiesen podido tener una figura cercana que les acompañara y aconsejara durante el arduo proceso que es estar en un tratamiento de reproducción asistida.

**ASEBIR:** Tal vez, una frase que puede ser compartida por la mayoría de l@s usuari@s de las técnicas es que "nadie vuelve a ser el mismo cuando la infertilidad entra en tu vida".

**Elena:** Por eso me encanta hacer esto... Además del asesoramiento, también realizo publicaciones divulgativas sobre temas interesantes que surgen en el día a día de los tratamientos, sobre todo dentro del laboratorio, que es la zona de más misterio ya que no es visible al paciente pero donde se lleva a cabo la mayor parte del trabajo para conseguir hacer posible la magia de crear vida.

**ASEBIR:** ¡Qué bonito es nuestro trabajo! Aunque duro y sacrificado muchas veces, merece la pena...

**Elena:** ¡Claro que la merece!

**ASEBIR:** Y ¿cómo ves el futuro, Elena?

**Elena:** El futuro lo veo brillante. Siento que he trabajado muy duro para aprender lo mejor y más rápido posible para poder dedicarme a este trabajo tan maravilloso y aunque la curva de aprendizaje de un embriólogo es complicada, estoy muy satisfecha de cómo he conseguido dominar las técnicas del laboratorio y de gestión para cumplir con el nivel de exigencia de la clínica. Así que cada día estoy más segura de que crecer como embrióloga está escrito en mi destino y estoy ilusionada por ver qué me depara el futuro.

**ASEBIR:** Y así deseamos que sea, y con esa trayectoria estamos seguros que así será...

Y aquí concluimos esta entrevista que nos ha despertado a todos una sonrisa... Gracias Elena por tu tiempo y por tu

alegría, que tanto nos has contagiado durante los días que hemos trabajado junt@s... y si alguien se pregunta "¿será más friolera por haber estado en nitrógeno líquido? ¿o justo todo lo contrario?" Tranquilos, no, no nos va a dejar con la duda.

**Elena:** He de decir que soy bastante friolera... yo hasta ahora lo achacaba a venir del clima tropical canario pero oye... a lo mejor es el nitrógeno líquido y no había caído jajaja.

Gracias a vosotros por todo lo que hacéis por los que nos dedicamos al mundo de la reproducción asistida, y nuevamente por esta oportunidad de compartir con vosotros un poquito de mi historia ¡Un abrazo cálido a todos!

**ASEBIR:** Y tú, socio que nos estás leyendo, ¿tienes algo que contarnos? Escribe a [asebir@asebir.com](mailto:asebir@asebir.com) y valoraremos tu historia. Queremos escucharos, ¡animaos! Gracias Elena, ¡ha sido un placer!



*Si quieres participar en esta sección, y tienes alguna habilidad fuera de nuestra profesión, no dudes en ponerte en contacto con nosotros a través de la secretaria en el correo [asebir@asebir.com](mailto:asebir@asebir.com).*

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

## FORMACIÓN CONTINUADA

### PRINCIPIOS BÁSICOS DE CRIOBIOLOGÍA BASIC PRINCIPLES OF CRYOBIOLOGY

**Autores de la Comisión Permanente del GIC:** Iris Martínez-Rodero, Miguel Gallardo Molina, Miquel Solé Inarejos, Silvia Tabar Roquet, Alberto Yoldi Chaure, Cristina de la Cruz Rodrigo, Cristina Mestre Ferrer, Raul Noblom Artigues.  
**Autores de la base del GIC:** Joan Roncero Carol, Anna Cabré Fàbregas

#### ► RESUMEN

El uso generalizado de las técnicas de criopreservación es una realidad que ha revolucionado la medicina reproductiva, permitiendo que la criopreservación de gametos, las transferencias embrionarias en diferido o la creación de criobancos formen parte de la práctica clínica diaria. Para garantizar el mejor desempeño en la aplicación de estas técnicas, así como para entender los nuevos avances que se producen en el campo, resulta crucial conocer los procesos fisicoquímicos que rigen un evento tan excepcional como es la preservación de la vida. Esta revisión pretende ofrecer una visión general de los principios más básicos que subyacen tras el proceso de enfriamiento y calentamiento, la acción de los crioprotectores o las principales técnicas de criopreservación: la congelación lenta y la vitrificación.

**PALABRAS CLAVE:** Criobiología, vitrificación, congelación lenta, crioprotectores, descongelación, calentamiento

#### ► SUMMARY

The field of reproductive medicine has been transformed since the widespread use of cryopreservation techniques, allowing gamete cryopreservation, deferred embryo transfers, or creation of cryobanks to be part of daily clinical practice. To guarantee a benchmark performance in the application of these techniques, as well as to understand the new advances occurring in the field, it is crucial to know the physical-chemical processes controlling such an exceptional event as the preservation of life is. This review aims to address a general view of the most basic principles underlying the cooling and heating process, the action of cryoprotectants, or the main cryopreservation techniques: slow freezing and vitrification.

**KEYWORDS:** cryobiology, vitrification, slow freezing, cryoprotectants, thawing, warming

**ASEBIR** **ZURICH**

Lo que se siente cuando... **...contratas Zurich.**

Te mejoramos el precio de tus seguros + Y además te llevas hasta 80€ de bienvenida

Oferta exclusiva para ti y tus familiares directos por estar asociado a ASEBIR

Estimada asociada o asociado, hay sentimientos que no se pueden explicar...

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

Por estar asociada o asociado a ASEBIR te mejoramos el precio de tus nuevos seguros y además te llevas hasta 80€\* de regalo.

Vente a Zurich y empieza a ahorrar.

Infórmate



Este correo electrónico fue enviado por: Zurich Insurance Company Ltd  
Address: 48, 8045 Zurich, Suiza

# FORMACIÓN CONTINUADA

PRINCIPIOS BÁSICOS DE CRIOBIOLOGÍA  
BASIC PRINCIPLES OF CRYOBIOLOGY

## 1. INTRODUCCIÓN

El término **criobiología** proviene de las raíces griegas kr-yos = frío; bio = vida y logos = estudio/ciencia. Así, la criobiología es la ciencia que estudia el comportamiento de la vida a bajas temperaturas. Engloba múltiples disciplinas; desde la Física, necesaria para comprender cómo ocurre la congelación, la Biología, que estudia los efectos del frío en los procesos bioquímicos y fisiológicos, hasta la Fisicoquímica, que explica el comportamiento de las soluciones acuosas a bajas temperaturas (Gordon, 1975). El gran interés por su estudio y conocimiento se debe a la capacidad que tiene el frío de conservar la materia viva mediante el proceso conocido como **criopreservación** (Arnaud, 1992; Petrushko et al., 2021).

Al descender a temperaturas bajo cero (-0,5°C), se ralentizan reversiblemente la gran cantidad de reacciones químicas que ocurren de forma constitutiva en una célula, tejido u organismo y que mantienen su homeostasis, **deteniendo la vida en el tiempo** y paralizando su inevitable descomposición (Horikawa et al., 2006). Si el descenso de la temperatura prosigue hasta temperaturas inferiores a -130°C, el estado sólido por cristalización se impone en la célula y su comportamiento termodinámico se aproxima a un sistema cerrado en equilibrio, donde la energía disponible es insuficiente para alcanzar la energía de activación de cualquier reacción metabólica (Vicente Antón, 2015). Esta relación entre la temperatura de los sistemas vivos y la velocidad a la que la maquinaria biológica está funcionando viene explicada por la ecuación de Arrhenius (Wowk, 2010):

$$k(T) = A \cdot e^{-\frac{E_a}{R \cdot T}}$$

Dónde k es una constante cinética que depende de la temperatura, A un factor preexponencial que depende de la frecuencia de las colisiones entre partículas,  $E_a$  la energía de activación, R la constante universal de los gases y T la temperatura.

Sin embargo, el gran contenido acuoso presente en las células tiende a formar hielo cuando la temperatura desciende, y cómo es de esperar, este proceso **no es inocuo para la célula** –modifica las propiedades biofísicas del medio intracelular y altera las membranas celulares, los organelos, las proteínas y los lípidos– salvo que se adopten ciertas

estrategias para evitarlo (Fahy et al., 1984; Wowk, 2010; Vicente Antón, 2015). En la naturaleza se encuentran diversos ejemplos de protección contra el frío y la congelación (Vicente Antón, 2015) (Figura 1).

*Figura 1. Rana de bosque o de la madera (Lithobates sylvaticus). Durante los fríos inviernos de Alaska y Canadá, es capaz de congelarse, quedando su respiración y su corazón paralizados. Su estrategia para sobrevivir consiste en el aumento de la síntesis de glucosa, que se concentra en el interior de las células, disminuye el punto de congelación y evita la formación de hielo dentro de sus células, funcionando como un anticongelante (Layne Jr and Lee Jr, 1987). Fuente de la imagen: <https://vevico.wordpress.com/2020/08/31/>*



Una de las estrategias empleadas por las técnicas de criopreservación es la **congelación lenta**, que mediante el uso de crioprotectores y un descenso controlado y lento de la temperatura minimiza la formación de hielo intracelular. Existe otra opción, la técnica de **vitrificación**, en la que se evita la formación de cristales de hielo mediante el uso de altas concentraciones de crioprotectores, sumado a un descenso muy rápido de la temperatura hasta alcanzar el estado vítreo (Kelly et al., 2003). Esta técnica, desde su estandarización en 2007, ha superado gran parte de los obstáculos que planteaba la criopreservación en el contexto de la reproducción asistida y desde entonces, se ha convertido en una parte integral de la medicina reproduc-

# FORMACIÓN CONTINUADA

PRINCIPIOS BÁSICOS DE CRIOBIOLOGÍA  
BASIC PRINCIPLES OF CRYOBIOLOGY

tiva, contribuyendo a su crecimiento y mejora durante las últimas dos décadas (Rienzi et al., 2017). Así, hoy en día son cada vez más comunes los tratamientos de criopreservación de gametos para preservar la fertilidad, ya sea por causas médicas o sociales, así como las criotransferencias o las transferencias en diferido de embriones (Cobo et al., 2022).

El objetivo del presente artículo es **proporcionar** las principales **bases de la criobiología** para permitir al **embriólogo clínico** comprender, sin un extenso conocimiento previo de física-química o termodinámica, el fundamento de las técnicas de criopreservación que usa diariamente en el laboratorio.

## 2. EVOLUCIÓN HISTÓRICA DE LA CRIOBIOLOGÍA

Hasta la década de 1940, poco después de la Segunda Guerra Mundial, la Biología recién salía de su preocupación por la taxonomía y la investigación a temperaturas bajo cero había sido un campo dominado por los físicos. Cuando en 1938 Basile J. Luyet y Eugene L. Hodapp publicaron por primera vez la congelación de espermatozoides de rana, en un artículo titulado "Revival of frog spermatozoa vitrified in liquid air", la Criobiología apenas terminaba su infancia. En el primer libro dedicado a la Criobiología, "Life and Death at Low Temperature", publicado en 1940 por Luyet y Marie Pierre Geheio, las referencias a la congelación biológica se reducían a 97 observaciones anecdóticas de muerte o supervivencia como la de Spallanzani, un científico italiano que describió en 1776 la supervivencia de algunos espermatozoides de caballo y de humano a bajas temperaturas. En 1949, Polge, Smith y Parkes, intentando replicar los experimentos de Luyet en espermatozoides de rana, descubrieron por accidente la propiedad del **glicerol** como crioprotector, iniciando una fase de evolución vertiginosa hasta las técnicas de criopreservación que conocemos hoy en día. La introducción del glicerol para criopreservar el semen de toro revolucionó la industria de la cría intensiva en bovino en la década de los 60. Más tarde, en 1972, Mazur, Whittingham y Leibo consiguieron congelar el primer embrión de ratón mediante **congelación lenta**. A partir de estos resultados, Mazur demostró la relación entre la velocidad de enfriamiento y la formación de hielo intracelular, estableciendo las bases termodinámicas que subyacían ese fenómeno (Sztein et al., 2018). Con el nacimiento de **Louise Brown en 1977** gracias a Edwards y Steptoe, el interés por la criopreservación de gametos y embriones creció exponencialmente. Sólo bastaron unos años para que **Trounson** publicara, en **1984**, el primer bebé naci-

do a partir de un embrión congelado (Trounson and Mohr, 1983). Así, la congelación lenta fue durante muchos años el método de criopreservación predominante, debido a que la vitrificación aún tenía algunas limitaciones que superar, como la necesidad de usar altas concentraciones de crioprotectores y volúmenes de muestra muy pequeños. En 1985 los investigadores Fahy y Rall demostraron la altísima eficacia que tendría la **vitrificación** para mantener la viabilidad de los ovocitos y embriones (Schiewe and Anderson, 2017) y cuatro años más tarde, Arav y colaboradores presentaron el método de la **"gota de mínimo volumen"** en embriones de ratón de 8 células (Arav, 1989; Arav, 2014). Aunque los primeros avances en la vitrificación se lograron en la segunda mitad de los años 80, esta técnica no se ha incorporado a la práctica clínica hasta más recientemente (Rienzi et al., 2017; Cobo et al., 2022). Hoy en día, los datos reflejan su éxito indiscutible: **en 2019 en España** se transfirieron alrededor de 39000 embriones vitrificados y más de 8.000 embriones derivados de ovocitos vitrificados (Sociedad Española de Fertilidad, 2021).

## 3. PRINCIPIOS FÍSICOS DE LOS PROCESOS DE CRIOPRESERVACIÓN

### 3.1. CINÉTICA DEL CRECIMIENTO DEL HIELO

El hielo comienza a formarse mediante el proceso estocástico de **nucleación**: cuando un grupo de moléculas de agua se unen en una estructura de enlaces de hidrógeno estables, forman lo que se conoce como un núcleo. Cuando el núcleo es de un tamaño crítico sirve como base para que se repita esta secuencia, resultando en el crecimiento del hielo (Pradzynski et al., 2012). La nucleación se produce con más facilidad en una interfase preexistente (nucleación heterogénea), lo que significa que siempre es catalizada por un agente nucleante (generalmente partículas presentes en la solución o superficies con las que la solución tiene contacto) (Fuller et al., 2004). Volviendo al caso del agua, a medida que se van formando núcleos, las moléculas de agua desordenadas en el líquido se reorganizan y toman la forma hexagonal de un cristal sólido: el hielo. Cuando este proceso ocurre en el medio líquido intracelular o el citosol, **el hielo** crecerá rápidamente hasta un tamaño físicamente dañino para las ultraestructuras biológicas y comprometerá su viabilidad, generalmente con consecuencias letales (Leibo et al., 1978; Karlsson et al., 1993).

Desde el punto de vista molecular, cuando una solución acuosa se enfría, la energía cinética de las moléculas de agua en agitación constante se reduce y los enlaces de hi-

# FORMACIÓN CONTINUADA

## PRINCIPIOS BÁSICOS DE CRIOBIOLOGÍA BASIC PRINCIPLES OF CRYOBIOLOGY

drógeno se vuelven más estables, favoreciendo la formación de la estructura cristalina típica del **hielo**. Sin embargo, si las características físicas de las moléculas en estado líquido se transforman en las de un sólido sin que se forme hielo en el proceso, el resultado es la formación de un **estado de vidrio rígido amorfo** (Kauzmann, 1948).

La nucleación y la cinética del crecimiento del hielo son fenómenos físicos complejos. En aras de la simplicidad, tiene sentido separar los factores que determinan la **probabilidad de formación de hielo** durante un procedimiento de vitrificación en dos categorías: por un lado, la tendencia a la transición vítrea de la parte líquida del sistema, la solución, y por otro, las tasas de enfriamiento y calentamiento a las que está sometido el sistema.

### 3.1.1. Tendencia de la solución a la transición vítrea

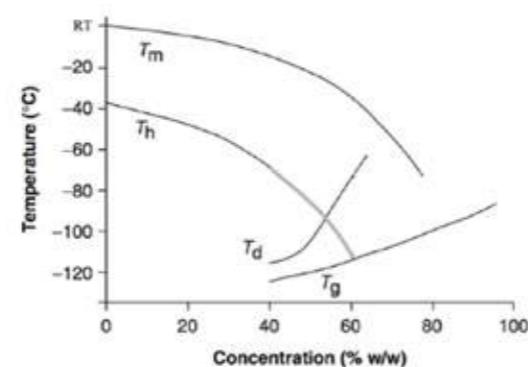
La formación de hielo se inhibe por la presencia de solutos, porque sus átomos interfieren directamente con los enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua necesarias para que se forme la estructura cristalina. Los solutos presentes también aumentan la viscosidad de la solución, reduciendo la agitación molecular y desafiando aún más la unión de las moléculas de agua. El **tipo y la cantidad de solutos presentes**, así como la **viscosidad** de la solución determinarán la facilidad con la que las moléculas de agua podrían reorganizarse en cristales de hielo, determinando cuánto tiempo puede permanecer la solución en el rango de temperaturas por debajo de la temperatura de fusión ( $T_m$ : melting temperature) y la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ : glass-transition temperature) sin formación de hielo. Dentro de una célula, la tendencia a la transición al estado vítreo del medio citosólico determinará si se formará hielo a **velocidades determinadas de enfriamiento y calentamiento** (Fahy et al., 1984). En conclusión, las velocidades de enfriamiento y calentamiento necesarias para evitar la formación de hielo están correlacionadas negativamente con la tendencia a la transición al estado vítreo de la solución. Una solución con mayor concentración de solutos y mayor viscosidad se puede enfriar y calentar a velocidades más lentas y, aun así, lograr el estado vítreo y volver al estado líquido sin formación de hielo. Las soluciones muy diluidas, por el contrario, requerirían velocidades de enfriamiento y calentamiento

### 3.1.2. Velocidades de enfriamiento y calentamiento

En una criopreservación llevada a cabo con éxito, la solución en el sistema debe enfriarse a altas velocidades en el

rango desde la  $T_m$  hasta la  $T_g$  para evitar la formación de hielo. De manera similar, el calentamiento a temperaturas por encima de la  $T_g$  hasta  $T_m$ , debe realizarse rápidamente para evitar la conversión del estado vítreo amorfo a hielo y la recrystalización (Rall, 1987). La **eficiencia térmica** del soporte de criopreservación, así como el volumen de solución que contiene la célula suspendida que se carga en él, influirán en la rapidez con la que se puede enfriar y calentar el sistema. Además, la solución extracelular debe tener una composición muy específica, ya que esta solución está en continuo intercambio osmótico con la célula hasta que se produce el enfriamiento (Shaw et al., 1997).

De hecho, la velocidad de calentamiento es la variable más determinante para la supervivencia de la célula a la vitrificación (Seki and Mazur, 2009), porque es más probable que durante este paso el hielo alcance un tamaño letal. Cuando examinamos la progresión de la temperatura durante el proceso de vitrificación en un hipotético diagrama de dos fases, es posible entender la razón (Figura 2).



**Figura 2.** Diagrama de fase hipotético del citosol de un ovocito humano en metafase II durante el procedimiento de vitrificación. La célula se pone en contacto con los crioprotectores a temperatura ambiente (25°C) durante la fase de equilibrio. Una vez incorporados los crioprotectores, la célula se enfría hasta los -196°C a una concentración de solutos dada. La vitrificación ocurre cuando se alcanza la  $T_g$  (temperatura de transición vítrea). El hielo podría formarse por debajo de la temperatura de fusión heterogénea ( $T_m$ ) o homogénea ( $T_h$ ). Durante el calentamiento, el hielo podría formarse de novo por encima de la temperatura de desvitrificación ( $T_d$ ) o podría crecer a partir de cristales ya formados (recrystalización). El diagrama está adaptado de Fahy (Tucker and Liebermann, 2015).

# FORMACIÓN CONTINUADA

## PRINCIPIOS BÁSICOS DE CRIOBIOLOGÍA BASIC PRINCIPLES OF CRYOBIOLOGY

A pesar de la concentración de soluto intracelular hipotéticamente alcanzada en el citosol de un ovocito en metafase-II después de haber sido preparado para la vitrificación (aproximadamente el 45% de los solutos por masa total de solución), todavía hay una tendencia muy alta a la formación de hielo durante el enfriamiento. La formación de hielo comienza a ser termodinámicamente favorable a temperaturas por debajo de la  $T_m$  del citosol hasta que se alcanza la  $T_g$ . Si se forma hielo durante el enfriamiento, muy por debajo de 0 °C (-50 °C, por ejemplo), la viscosidad de la solución a esa temperatura aumenta hasta tal punto que el núcleo formado difícilmente puede crecer y, por tanto, será inocuo. Por esa razón, es menos probable que ocurra la formación de hielo letal durante el enfriamiento. Por otro lado, **durante el calentamiento**, existe el **riesgo de formación de hielo de novo** por encima de la temperatura de  $T_g$ ; y aún más importante, existe el riesgo de crecimiento de cristales de hielo previamente formados durante el enfriamiento, conocido como **recrystalización** (Seki and Mazur, 2009). Estos núcleos de hielo previamente formados ahora tienen una alta tendencia a crecer, a medida que aumenta la temperatura y la viscosidad disminuye. Esa es la razón por la que, como se mencionó anteriormente, **el calentamiento debe tener lugar en una velocidad más rápida que el enfriamiento**: primero para evitar la formación de hielo de novo, y, sobre todo, para evitar la recrystalización. Dicho de otro modo, el crecimiento de hielo durante el enfriamiento generalmente se verá limitado porque el proceso de nucleación ocurre a una temperatura a la cual la viscosidad es alta, lo que obstaculiza la movilidad de las moléculas de agua y la velocidad de formación de hielo. Sin embargo, hay que tener en cuenta que durante el calentamiento el hielo crecerá hasta alcanzar un tamaño letal si el aumento de temperatura no es suficientemente rápido (Fahy et al., 1984).

### 3.2. PARÁMETROS BIOFÍSICOS DE LAS CÉLULAS

Las células son sensibles a los cambios osmóticos en el medio extracelular. Así, si se encuentran en condiciones hiposmóticas (osmolaridad del medio extracelular < medio intracelular), las células aumentarán de tamaño a consecuencia de la entrada de agua y si por el contrario, las condiciones extracelulares son hiperosmóticas (osmolaridad del medio extracelular > medio intracelular), las células reducirán su volumen por la salida de agua (Ávila-Portillo et al., 2006). Así, **los movimientos de agua y crioprotectores** a través de las membranas celulares durante los procesos de criopreservación se rigen por una serie de **parámetros** que son definidos para cada tipo celular a diferentes temperaturas. Los parámetros más comúnmente estudiados son:

- El volumen osmóticamente inactivo ( $V_b$ ): es el agua que, ante un aumento de la osmolaridad extracelular, siempre quedará en el interior de la célula asociada a las estructuras y macromoléculas presentes en el citoplasma (Merymann, 1971)
- La permeabilidad de la membrana celular al agua ( $L_p$ ) y a los crioprotectores ( $P_s$ ) (Devireddy, 2000)
- La relación superficie-volumen (Gilmore, 2000)

## 4. PRINCIPIOS QUÍMICOS DE LA CRIOPRESERVACIÓN

### 4.1. TRANSPORTE DE SOLUTOS Y AGUA A TRAVÉS DE LAS MEMBRANAS

Durante los procesos de criopreservación, el movimiento de las moléculas a través de la membrana celular se ve dificultado por las bajas temperaturas (producen un aumento de la rigidez de la membrana) y la rapidez con la que ocurren los cambios osmóticos. La actividad de las bombas dependientes de ATP que participan en el transporte activo se reduce en un 60% cuando la temperatura baja de 25°C a 10°C. Por ello, el transporte de solutos y agua está principalmente dominado por los procesos de **difusión** y **ósmosis** durante los momentos de estrés osmótico (Whalley, 2021) (véase Figura 3).

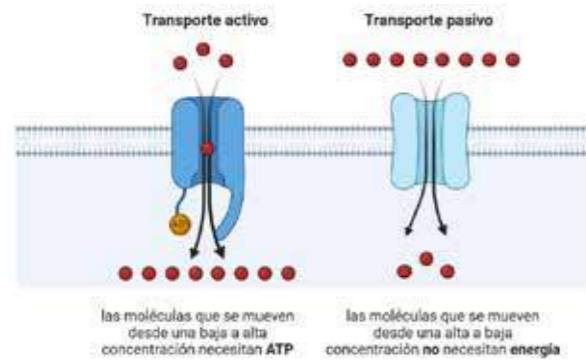
La **difusión** (tanto simple como facilitada) se define cómo la distribución homogénea de moléculas de una sustancia, que tiende a ocupar todo el espacio que le es accesible. Si hay presente una membrana, la ley de Fick define que la velocidad de difusión es proporcional a una constante que depende de las propiedades de la membrana (grosor, área de sección transversa y permeabilidad a un determinado soluto) y de cada soluto en particular (Chatterji, 2004).

La **ósmosis**, cómo ya se ha tratado anteriormente, es un caso concreto de difusión donde es el disolvente el que se mueve. En el medio celular, el agua (el disolvente más común) atraviesa las membranas semipermeables desde soluciones con baja concentración de solutos a soluciones con alta concentración de solutos. La concentración de solutos se traduce en presión osmótica: la presión hidrostática generada en la membrana que separa un gradiente de concentración a cada lado. Se suele expresar en osmoles (Osm) y depende del número de partículas disueltas (moles) por unidad de volumen (Chatterji, 2004).

# FORMACIÓN CONTINUADA

## PRINCIPIOS BÁSICOS DE CRIOBIOLOGÍA BASIC PRINCIPLES OF CRYOBIOLOGY

**Figura 3.** Diagrama que representa los dos principales tipos de transporte en la célula: el transporte activo y pasivo. La difusión es el tipo de transporte predominante en los procesos de criopreservación. Figura creada con Biorender.com.



### 4.2. CRIOPROTECTORES

Los CPAs son moléculas que se utilizan para proteger las células durante los procesos de criopreservación, estabilizando las proteínas intracelulares, reduciendo la formación de hielo intracelular y moderando el impacto de la concentración de solutos intra y extracelular. Todos son miscibles en agua, hiperosmóticos y presentan toxicidad concentración-dependiente (Gardner et al., 2012; Elder and Dale, 2020).

Según su capacidad de atravesar la membrana celular se dividen en **crioprotectores permeables** y **no permeables**.

Los **crioprotectores permeables** como el glicerol, etilenglicol (EG), 1,2- propanediol (PROH) y el dimetilsulfóxido (DMSO), son moléculas de bajo peso molecular. Son capaces de penetrar a través de la membrana celular y estabilizar las proteínas intracelulares, reducir la temperatura a la que se forma hielo intracelular y minimizar el daño osmótico ocasionado por los efectos de la concentración de electrolitos. Sin embargo, su presencia en el medio intracelular comporta efectos tóxicos sobre la célula (Elder and Dale, 2020).

Los **crioprotectores no permeables**, como son la glucosa, sacarosa y trehalosa, son moléculas de alto peso

molecular que no son capaces de atravesar la membrana celular, quedándose así en el espacio extracelular y facilitando la salida de agua por osmosis. Esto ayuda a que los crioprotectores permeables puedan entrar, aumentar su concentración intracelular y consecuentemente evitar la formación de cristales de hielo y daño celular (Wowk, 2010; Liebermann, 2017). El papel de los crioprotectores durante el calentamiento también es crucial. En el primer paso del calentamiento, la célula sale del nitrógeno líquido y entra en contacto con un medio a 37°C. Al pasar del estado vítreo, con una concentración de solutos intracelular muy alta, se produce una entrada rápida de agua desde el medio que podría provocar un choque osmótico. Sin embargo, esto no ocurre gracias a la alta concentración de crioprotectores no permeables presente en el medio de calentamiento que contrarresta la alta concentración de crioprotectores permeables dentro de la célula y reduce la diferencia de osmolaridad entre los compartimentos intra y extracelulares (Liebermann, 2017).

En un intento de ilustrar lo que pasa cuando una célula entra en contacto con los CPAs, es necesario visualizar las células cuando se contraen osmóticamente inmediatamente por la pérdida de agua debido a la diferencia de presión osmótica entre la solución extracelular, concentrada en CPAs, y la intracelular (milleu). Para los gametos/embriones, una solución isotónica tiene una osmolaridad de aproximadamente 300 mOsm. Cuando un gameto/embrión se transfiere a una solución hipertónica (>300 mOsm), el CPA permeable comienza a penetrar progresivamente la célula por difusión simple, y después el agua comienza a entrar en la célula para mantener el equilibrio osmótico entre las soluciones extracelular e intracelular. Al final, cuando se ha establecido el equilibrio, el gameto/embrión tiene la misma concentración de CPA que la solución en la que se encuentra suspendido, y la presión osmótica del citoplasma celular es la misma que la del medio de suspensión. Algunas variables determinan la rapidez con la que se establece este equilibrio (Rall, 1987):

- propiedad de permeabilidad del soluto específico (por ejemplo, el EG entrará en la célula más rápido que glicerol)
- concentración de CPA (cuanto mayor sea la concentración, más rápido penetrará el CPA en las células)
- temperatura (cuanto mayor sea la temperatura, más rápido entrará el CPA)
- etapa de desarrollo
- especie

# FORMACIÓN CONTINUADA

## PRINCIPIOS BÁSICOS DE CRIOBIOLOGÍA BASIC PRINCIPLES OF CRYOBIOLOGY

### 5. PRINCIPALES EFECTOS DE LA CRIOPRESERVACIÓN EN LAS CÉLULAS

Los daños celulares inducidos por los procesos de criopreservación se explican por dos fenómenos: el estrés osmótico por la deshidratación celular y la formación de hielo intracelular (Ávila-Portillo et al., 2006; Vicente Antón, 2015) (véase Figura 4).

#### 5.1. ESTRÉS OSMÓTICO POR DESHIDRATACIÓN

Desde que el primer cristal de hielo aparece en el medio donde se encuentran las células, la presión osmótica extracelular aumenta rápidamente en la parte del medio que aún no está congelada. Para reestablecer el equilibrio osmótico entre el medio intra- y extracelular, el agua sale de la célula. Así, la célula comienza a deshidratarse progresivamente, pudiendo llegar a alterarse la conformación de proteínas, fosfolípidos y ácidos nucleicos si se llega al porcentaje de volumen osmóticamente inactivo (el 10% del agua celular está unida mediante puentes de hidrógeno a la superficie de estas macromoléculas) (Vicente Antón, 2015). La hipótesis de Meryman del "volumen celular mínimo" va más allá, y postula que a medida que la célula pierde volumen por la salida de agua en respuesta al aumento de osmolaridad extracelular, la compresión del contenido citoplasmático aumenta. Si se excede la resistencia física de la membrana, también se producirán cambios irreversibles en su permeabilidad (Meryman, 1971).

#### 5.2. FORMACIÓN Y CRECIMIENTO DEL HIELO INTRACELULAR

Los daños mecánicos en las células están determinados por el volumen total y el tamaño de los cristales de hielo. Como ya se explicó anteriormente (véase apartado 3.1.), las dinámicas de formación y fusión del hielo se relacionan con las concentraciones de los solutos intra- y extracelulares, mientras que la cantidad y el tamaño de los cristales es inversamente proporcional a la velocidad de congelación utilizada: una congelación rápida dará lugar a cristales intracelulares de tamaño pequeño y una congelación lenta producirá una deshidratación celular progresiva, siendo nulo o escaso el hielo intracelular formado (Vicente Antón, 2015). No obstante, independientemente de la velocidad de congelación, la fusión del hielo extracelular durante la descongelación produce un fuerte gradiente osmótico con un elevado flujo de agua hacia el interior de la célula que puede dañarla, de no ser controlado por la presencia de un CPA no permeable (véase apartado 4.2.).

Los experimentos realizados en diferentes tipos celulares confirman una relación inversa entre la superficie de intercambio

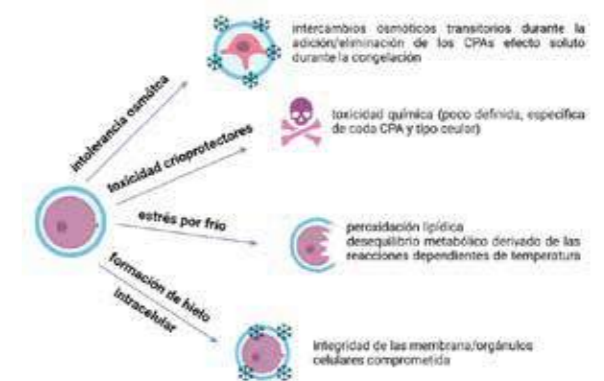
(tamaño) y la velocidad óptima de congelación, siendo muy complicado calcularla a priori (Ávila-Portillo et al., 2006). Está generalmente aceptado que los espermatozoides requieren una velocidad óptima de congelación de -100 a -200°C/min (Gilmore, 1997; Gilmore, 2000) y los ovocitos y los embriones de -20.000 a 23.000°C/min (Gupta, 2010; Kuwayama, 2007)

### 5.3. ALTERACIONES METABÓLICAS Y ESTRUCTURALES EN LAS CÉLULAS

Durante la criopreservación, las células no sólo sufrirán el efecto mecánico asociado a la presencia de hielo, sino además los derivados de la modificación de las características del medio intracelular (pH y viscosidad), así como el efecto del descenso de la temperatura sobre los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos que conllevan a alteraciones en las propiedades de sus membranas (e.g. aumento de la rigidez), citoesqueleto (e.g. despolimerización del huso meiótico), la organización del citosol, el metabolismo (actividad enzimática) y la expresión génica (cambios epigenéticos) (Issuig, 2019).

No obstante, todos los daños anteriormente señalados suelen ser paliados con la buena práctica de los métodos de criopreservación, que contemplan el uso de la concentración adecuada de CPAs así como de las velocidades óptimas de enfriamiento y calentamiento.

**Figura 4.** Principales efectos dañinos durante la criopreservación en las células. Adaptado de Woods et al., 2016 y creado con Biorender.com



# FORMACIÓN CONTINUADA

PRINCIPIOS BÁSICOS DE CRIOBIOLOGÍA  
BASIC PRINCIPLES OF CRYOBIOLOGY

## 6. PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVACIÓN

Los protocolos de criopreservación de células actuales pueden diferenciarse en función de la concentración de CPAs, el tiempo que toma el procedimiento, así como si la célula alcanza el equilibrio osmótico durante el proceso o si hay formación o no de hielo intracelular (Vicente Antón, 2015). El tipo y el tamaño celular y su tolerancia a los CPAs y el enfriamiento definirán el procedimiento a utilizar (Vicente Antón, 2015).

### 6.1. CONGELACIÓN LENTA

La congelación lenta, también conocida como criopreservación en equilibrio, intenta evitar la formación de hielo intracelular mediante la deshidratación. Los medios de congelación lenta suelen estar compuestos por concentraciones en torno a 1,5 M de CPAs permeables (generalmente EG, aunque también DMSO o glicerol) en un medio básico (e.g. TCM199) tamponado con fosfato y suplementado con un 20% de suero o fuentes proteicas más sofisticadas como la HPC (Hidroxypropyl Celulose). Los medios también pueden constar de CPAs no permeables (sacarosa, trehalosa, PVP) a concentraciones alrededor de 0,25-0,5 M. La adición del medio de congelación puede realizarse en una o varias etapas, dependiendo de la sensibilidad de las células a las variaciones osmóticas. Por su parte, la eliminación del medio tras la congelación se realizaría tras una o varias etapas, según el protocolo de adición (véase apartado 5.3.) (Vicente Antón, 2015).

En general, todos los protocolos de congelación se pueden dividir en las siguientes etapas (véase Figura 5):

- Fase de enfriamiento (20° a -7°C):** el medio de congelación aún está por encima de su punto de congelación concreto. Se produce la deshidratación gradual de la célula por la presencia de CPAs a bajas concentraciones.
- Fase de superenfriamiento (-7°C):** el medio de congelación inicia el **cambio de estado** por debajo de su punto de congelación, que suele producirse de manera controlada mediante el procedimiento conocido como **seeding**. Consiste en la inducción de la cristalización a -6° o -7°C que puede realizarse muy fácilmente con el contacto del exterior del soporte de congelación con unas pinzas metálicas previamente sumergidas en ni-

trógeno líquido. El objetivo de este paso es evitar los riesgos de un superenfriamiento excesivo: el cambio de estado del medio de congelación de líquido a sólido lleva asociada la liberación del calor latente de fusión, aumentando la temperatura y modificando así el equilibrio osmótico entre el medio intra- y extracelular. Si la subida de temperatura se acerca a la de fusión, se produce el fenómeno de recristalización que modifica el tamaño de los cristales de hielo, que podría afectar a las membranas de los gametos/embriones.

- Fase de equilibrio tras inducir el cambio de estado (-7°C).** Con el seeding, la formación de cristales de hielo en la solución permite que la fase líquida restante se vuelva más concentrada. Así, a medida que se va reduciendo la temperatura, se forma más hielo y la fase residual no congelada se concentra cada vez más (ambiente hipertónico, alta presión osmótica), lo que hace que las células se deshidraten por ósmosis (ver 4.1.). En estudios criomicroscópicos sobre la congelación de ovocitos y embriones a velocidades lentas (-1°C/min), se observa que, una vez iniciada la congelación del medio extracelular, se produce un flujo de agua desde la célula con el fin de reestablecer el equilibrio osmótico. La consecuente pérdida progresiva de volumen parece alcanzar su máximo a -40°C, donde se ha demostrado la ausencia de hielo intracelular.
- Fase de congelación hasta la temperatura previa a la inmersión en nitrógeno líquido (-7°C a -32°C).** Una vez alcanzado el punto de máxima reducción del volumen celular, es posible incrementar la velocidad de congelación cientos de veces sin que se produzca la formación de hielo intracelular. La cantidad de agua que sale de la célula depende de la tasa de enfriamiento: a velocidades lentas de enfriamiento, las células pueden permanecer en equilibrio con las soluciones externas más tiempo. A medida que aumenta la velocidad de enfriamiento, hay menos tiempo para que el agua salga de la célula. La tasa de enfriamiento óptima resulta del equilibrio entre estos dos fenómenos. A tasas de enfriamiento más lentas, la muerte celular se debe a largos períodos de exposición a condiciones hipertónicas, mientras que a tasas más rápidas la muerte celular se asocia a la formación de hielo intracelular, que es inevitablemente letal. La velocidad óptima de enfriamiento depende de varios factores: volumen celular y área de superficie, permeabilidad al agua y tipo y concentración de CPA (Rall, 1987).

### 6.2. VITRIFICACIÓN

La vitrificación es un enfoque alternativo a la congelación lenta, que evita la formación de cristales de hielo en el espacio intra y extracelular (Kuwayama, 2007). El **estado vítreo** mantiene la distribución espacial molecular e iónica del estado líquido, pudiendo considerarse como un líquido superenfriado extremadamente denso. En el método clásico de congelación lenta, cuando la temperatura va disminuyendo y la célula ya se ha deshidratado suficientemente, el citoplasma junto con el medio de congelación concentrado en el espacio extracelular, se convierten en un sólido vítreo sin formación de hielo. Por el contrario, en el procedimiento de vitrificación, las células se deshidratan justo antes de que comience el proceso de enfriamiento mediante la exposición a concentraciones de CPA lo suficientemente altas como para alcanzar el estado vítreo en el espacio intra- y extracelular. Así, esta transformación se logra con la combinación entre concentraciones elevadas de CPA (4-8 M) y velocidades de enfriamiento extremadamente altas (Vicente Antón, 2015) (véase 3.1.1).

El principal riesgo del procedimiento de vitrificación es la posible citotoxicidad que la **alta concentración de CPA** necesaria podría suponer. Sin embargo, las estrategias para limitar esta potencial toxicidad son (Gupta, 2010):

- El uso combinado de diferentes tipos de CPA (permeables y no permeables), disminuyendo así la concentración relativa de cada uno (véase 4.2.).
- La reducción del tiempo de exposición de las células a las soluciones de vitrificación. Por lo general, la adición de los CPAs se realiza en dos etapas: la primera de ellas es a temperatura ambiente (25°C) durante un período de equilibrio de 3-10 min con concentraciones de 5-7,5 M de CPAs. La segunda, es extremadamente breve (30-60s) dado que la concentración de CPAs asciende a 15M.
- La reducción de la temperatura a la que se exponen las células a las soluciones de vitrificación a 20°-25°C

Para lograr **mayores velocidades de enfriamiento** (véase 3.1.2), se utiliza el menor volumen posible de solución en exitosos soportes específicos para la vitrificación, que pueden diferenciarse en abiertos (si el contacto con el nitrógeno líquido es directo) o cerrados (si el contacto con el nitrógeno líquido es indirecto) (Gupta, 2010).

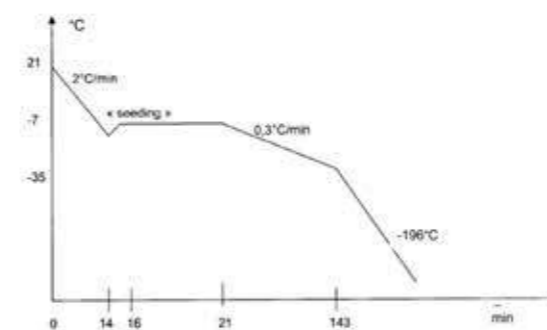


Figura 5. Fases del protocolo de congelación lenta.

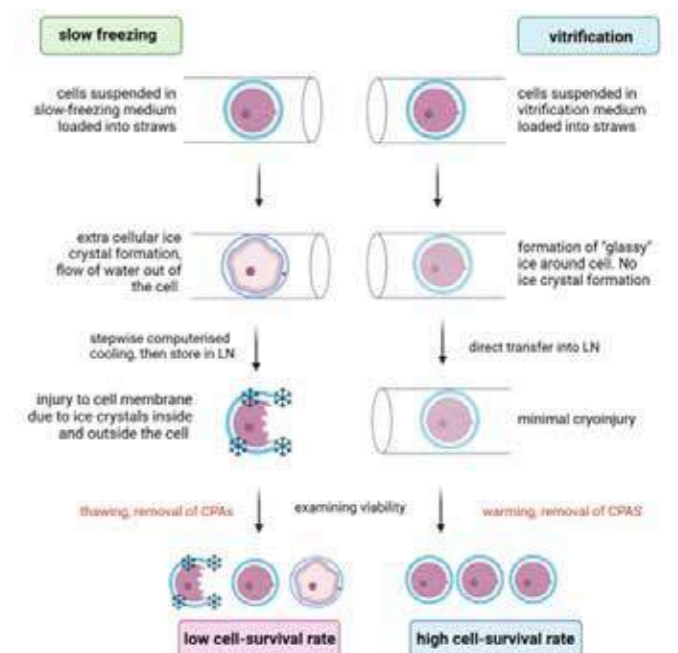


Figura 6. Diagrama representando las principales diferencias entre la congelación lenta y la vitrificación (Singh, Mal et al. 2019).

# FORMACIÓN CONTINUADA

## PRINCIPIOS BÁSICOS DE CRIOBIOLOGÍA BASIC PRINCIPLES OF CRYOBIOLOGY

### 6.3. DESCONGELACIÓN/CALENTAMIENTO Y EXTRACCIÓN DE LOS CPAS

Finalmente, hay que tener en cuenta que la congelación/vitrificación es solo la mitad de la historia. Para funcionar, una célula criopreservada debe volver a su temperatura fisiológica normal, sobreviviendo a la descongelación y el calentamiento del hielo que la acompañan (Fuller et al., 2004). Como ya se trató en apartados anteriores, durante la **descongelación/calentamiento** dos procesos pueden **reducir** de manera drástica la **supervivencia** de las células criopreservadas: la formación de cristales de novo, recristalización (véase 3.1.2.) y la formación de un fuerte gradiente osmótico a consecuencia de la fusión drástica del hielo intracelular en el contexto de una descongelación rápida (véase 4.2.). Para solucionar lo primero, se emplean velocidades de calentamiento más altas que las de enfriamiento. Para contrarrestar lo segundo, se usan soluciones de dilución que contienen CPAs no permeables, que sirven como amortiguadoras para disminuir la probabilidad del choque osmótico por la rápida entrada de agua a la célula que estaba deshidratada. Además, dada la toxicidad de los CPAs permeables presentes en la célula tras la rápida descongelación/calentamiento, el CPA no permeable facilita el intercambio progresivo por agua y la consecuente rehidratación de la célula, hasta que, idealmente, vuelve a su estado inicial previo a la criopreservación (Vicente Antón, 2015).

## 7. CONCLUSIONES

Tras este recorrido progresivo a través de los principios básicos de la criobiología, resulta pertinente preguntarse con qué profundidad necesita un embriólogo clínico asimilar y retener estos conceptos. Para conseguir resultados de referencia, es crucial conocer el fundamento de las técnicas de criopreservación que se usan en el laboratorio, no sólo para poder elegir cuál es la más apropiada para unas condiciones dadas, sino también para encontrar y solucionar las posibles fuentes causantes cuando hay una disminución en el éxito de la práctica.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arav A. Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology* 2014; 81: 96-102.

Arav A. Vitrification of oocytes and embryos. DVM Thesis. 1989. University of Bologna.

Arnaud F. Future in cryopreservation. *IJAO* 1992; 15: 637-640.

Ávila-Portillo LM, Madero JI, López C, León MF, Acosta L, Gómez C, et al. Fundamentos de criopreservación. *Rev Colomb Obstet Ginecol* 2006; 57: 291-300.

Chatterji A, Kotnala S, Matthew R. Effect of salinity on larval growth of horseshoe crab, *Tachypleus gigas* (Müller). *Current science* 2004; 3: 248-250.

Cobo A, Coello A, Hassane M, Remohí J. (2022). Oocyte and Embryo Cryopreservation: Methodology and Clinical Results. En Grynberg M, Patrizio P, editores. *Female and Male Fertility Preservation*. 1º ed., Cham: Springer; 2022. p. 97-118.

Devireddy RV, Swanlund, DJ, Roberts KP, Pryor JL, Bischof JC. The effect of extracellular ice and cryoprotective agents on the water permeability parameters of human sperm plasma membrane during freezing. *Human Reproduction* 2000; 15: 1125-1135.

Elder K, Dale B. *In-vitro fertilization*. 4º ed. Cambridge University Press; 2020.

Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 1984; 21: 407-426.

Fuller BJ, Lane N, Benson EE. *Life in the frozen state*. 1º ed. Boca Raton. CRC press. 2004.

Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*. 4º ed. London: CRC Press; 2012.

Gilmore JA, Liu J, Gao DY, Critser, JK. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. *Human reproduction* 1997; 12: 112-118.

Gilmore JA, Liu J, Woods EJ, Peter AT, Critser JK. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Human Reproduction* 2000; 15: 335-343.

Gordon W J. The Vocabulary of Cryonics. *AM Speech* 1975; 50: 132-135.

Gupta MK, Lee HT. Cryopreservation of Oocytes and Embryos by Vitrification. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine* 2010; 37: 267-291.

# FORMACIÓN CONTINUADA

## PRINCIPIOS BÁSICOS DE CRIOBIOLOGÍA BASIC PRINCIPLES OF CRYOBIOLOGY

Horikawa DD, Sakashita T, Katagiri C, Watanabe M, Kikawada T, Nakahara Y, et al. Radiation tolerance in the tardigrade *Milnesium tardigradum*. *Int J Radiat Biol* 2006;82: 843-848.

Iussig B, Maggiulli R, Fabozzi G, Bertelle S, Vaiarelli A, Cima-domo D et al. A brief history of oocyte cryopreservation: Arguments and facts. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica* 2019; 98: 550-558.

Karlsson JO, Cravalho EG, Rinkes IB, Tompkins RG, Yarmush ML, Toner M. Nucleation and growth of ice crystals inside cultured hepatocytes during freezing in the presence of dimethyl sulfoxide. *Biophysical journal* 1993; 65: 2524-2536.

Kauzmann W. The nature of the glassy state and the behavior of liquids at low temperatures. *Chemical reviews* 1948; 43: 219-256.

Kelly SM, Buckett WM, Abdul-Jalil AK, Tan SL. The cryobiology of assisted reproduction. *Minerva Ginecol* 2003; 55: 389-398.

Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. *Theriogenology* 2006; 67: 73-80.

Layne Jr JR, Lee Jr RE. Freeze tolerance and the dynamics of ice formation in wood frogs (*Rana sylvatica*) from southern Ohio. *Can J Zool* 1987; 65: 2062-2065.

Leibo SP, McGrath JJ, Cravalho EG. Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilized mouse ova as a function of cooling rate. *Cryobiology* 1978; 15: 257-271.

Liebermann J. Chapter11 Human embryo vitrification. *Methods Mol Biol* 2017; 1568: 141-159.

Meryman HT. Cryoprotective agents. *Cryobiology* 1971; 8: 173-183.

Petrushko M, Piniaviev V, Yurchuk T. The history of assisted reproductive technologies: from prohibition to recognition. *J History of Sci Technology* 2021; 11: 315-328.

Pradzynski CC, Forck RM, Zeuch T, Slaviček P, Buck U. A fully size-resolved perspective on the crystallization of water clusters. *Science*. 2012; 337:1529-1532.

Rall WF. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 1987; 24: 387-402.

Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R, LaBarbera AR, Kaser DJ, Ubaldi FM, et al. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for

the development of global guidance." *Hum. Reprod. Update* 2017; 23: 139-155.

Schiewe MC, Anderson RE. Vitrification: The pioneering past to current trends and perspectives of cryopreserving human embryos, gametes and reproductive tissues. *J Biorepos Sci Appl Med* 2017; 5: 1-12.

Singh B, Mal G, Gautam SK, Mukesh M. Cryopreservation of oocytes and embryos. En Singh B, Mal G, Gautam SK, Mukesh M, editores. *Advances in Animal Biotechnology*. 1º ed. Cham: Springer; 2019. p. 97-108.

Sociedad Española de Fertilidad (SEF). Registro Nacional de Actividad 2019-Registro SEF. 2021.

Sztejn JM, Takeo T, Nakagata N. History of cryobiology, with special emphasis in evolution of mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* 2018; 82: 57-63.

Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983; 305: 707-709.

Tucker M, Liebermann J. *Vitrification in assisted reproduction*. 2º ed. Boca Raton: CRC Press; 2015.

Vicente Antón JS. Bases de la criopreservación celular. En: Vicente Antón JS, Marco-Jiménez F, Jiménez Trigos ME, Mócé Cervera E, editores. *Criobiología de gametos, embriones y tejidos*. 1ªed. Valencia: Universitat Politècnica de València; 2015. p. 2-19.

Whaley D, Damyar K, Witek RP, Mendoza A, Alexander M, Lakey JR. Cryopreservation: An overview of principles and cell-specific considerations. *Cell Transplantation* 2021; 30: 123-128.

Woods EJ, Thirumala S, Badhe-Buchanan SS, Clarke D, Mathew AJ. Off the shelf cellular therapeutics: factors to consider during cryopreservation and storage of human cells for clinical use. *Cytotherapy* 2016; 18: 697-711.

Wowk B. Thermodynamic aspects of vitrification. *Cryobiology* 2010; 60: 11-22.

## ESTANCIAS FORMATIVAS



**ANA  
CARBAJO UÑA**

Durante mi estancia en la sede central del European Molecular Biology Laboratory (EMBL), en Heidelberg (Alemania), tuve la oportunidad conocer el trabajo diario del servicio de transgénesis, encargado de dar soporte a varios grupos de investigación del propio centro en la generación de líneas de ratones modificados genéticamente (transgénicos).

El procedimiento de transgénesis consiste en insertar, cambiar o eliminar secuencias de ADN en el material genético de los animales. En función de cuál sea la pregunta científica, es posible tanto insertar un gen que se traduzca en una proteína biológicamente activa, como modificar o silenciar

un gen específico en el animal receptor. Para ello, se utilizan dos métodos principalmente: microinyección de cigotos y microinyección de células madre embrionarias o ESCs. Ambos métodos permiten tanto la introducción directa de ADN extraño (que se integra en el genoma de forma aleatoria) como la incorporación de los componentes del sistema CRISPR/Cas 9 (que edita el genoma en un sitio específico). No obstante, en el servicio de transgénesis del EMBL existe una mayor tendencia hacia la microinyección de cigotos para evitar la generación de ratones quiméricos en casos indeseados, riesgo altamente asociado a la modificación de ESCs y posterior inyección en embriones tempranos de ratón.

## ESTANCIAS FORMATIVAS

ANA CARBAJO UÑA

Gracias a la enorme disposición de la responsable del servicio, tuve la oportunidad de participar activamente en varias sesiones microinyección de cigotos, previa recuperación de los mismos. Tras el sacrificio de las hembras correspondientes, se recuperan los cigotos presentes en la zona ampular. Me llamó la atención el alto número de cigotos recuperados por cada hembra, en torno a 30-40 aproximadamente. Una vez recuperados los cigotos y teniendo preparado el mix de edición genética, se pasa al proceso de microinyección. Tras observar varias inyecciones de forma completa y recibir las indicaciones y consejos pertinentes, tuve la oportunidad de familiarizarme con la técnica y terminar ejecutando el proceso de forma semi-autónoma.

La limitada accesibilidad de los embriólogos junior para practicar ICSI en clínica es una realidad conocida, por lo que haber tenido la oportunidad de trabajar con material murino supone un gran avance en mi formación profesional. ¡Me siento muy privilegiada por ello!

Por otra parte, en el servicio de transgénesis también se llevan a cabo tareas de criopreservación para el almacenamiento seguro de espermatozoides o embriones de ratón en nitrógeno líquido. Estos procedimientos se realizan de forma habitual para preservar las líneas murinas que no estén en uso en ese momento. Las líneas criopreservadas también se pueden revitalizar en el servicio. Tuve la oportunidad de observar y practicar la criopreservación tanto de espermatozoides como de embriones y comentar particularidades con respecto a los procedimientos análogos en humanos.

Además, la estancia en el centro me permitió disfrutar de la atmósfera de excelencia científica que tanto caracteriza al EMBL. Asistí a varias charlas y seminarios científicos sobre temas relacionados con la biología del desarrollo, tuve la oportunidad de conocer todas las instalaciones del centro, relacionarme con algunos investigadores principales y compartir debates y, sobre todo, aprender del ambiente multidisciplinar e internacional de uno de los mejores centros de investigación en biología molecular y genética a nivel mundial.

Por último, me gustaría dar las gracias a ASEBIR por concederme esta beca y darme esta oportunidad única; y a Isabel Rollán, responsable del servicio de transgénesis del EMBL, por haberme acogido y enseñado con tanto cariño y paciencia.

*Si quieres participar en esta sección y compartir tu experiencia personal, no dudes en ponerte en contacto con nosotros a través de la secretaria en nuestra dirección de correo [asebir@asebir.com](mailto:asebir@asebir.com).*





### LABO C-TOP



Incubador de sobremesa.  
Zonas calefactadas independientes.



### CABINA FLUJO LAMINAR VERTICAL TERMOSTATIZADA



Con fuentes de iluminación OCC (tipo Hoffman).



### EMBRYOGLUE



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



### LABWARE VITROLIFE



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



### 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.



### 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.



### PIPETAS PARA MANIPULACIÓN DE EMBRIONES Y OVOCITOS



De borosilicato MEA-testado con punta recta y atraumática.  
Para usar con bulbo de silicona (incluido) con volumen menor del 75% de la pipeta.  
Con dimensiones comprobadas individualmente.



### MICROPIPETAS VITROLIFE



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



# PREMIO A LA INNOVACIÓN MERCK ASEBIR 2021

## CLONACIÓN GAMÉTICA POR GENERACIÓN DE ANDROGENOTAS HUMANAS: CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y EDICIÓN GENÓMICA POR CRISPR-CAS9

### GAMETE CLONING BY HUMAN ANDROGENOTES: GENETIC ASSESSMENT AND CRISPR-CAS9 GENOMIC EDITING

**María José Escribà<sup>1,2,3</sup>, Rosa Bautista-Llàcer<sup>4,5</sup>, Noelia Grau<sup>1</sup>, Andrea Oller<sup>4,5</sup>, Laura Escrich<sup>1</sup>, Xavier Vendrell<sup>4,5</sup>**

1. IVF Laboratory. IVI-RMA-Valencia. Plaza Policía Local 3, 46015 Valencia. Spain

2. Grupo de investigación en Medicina Reproductiva, Fundación FIVI, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS LA FE), Valencia. Spain VI Foundation. Av. Fernando Abril Martorell 106. Torre A. 46026 Valencia. Spain

3. Instituto de Ciencia y Tecnología Animal. Universitat Politècnica de València. Edificio 7G. Camino de Vera s/n. 46022 València. Spain.

4. Reproductive Genetics Unit. Sistemas Genómicos. Ronda G. Marconi 6, 46980 Paterna (València), Spain.

5. Citogenomics Unit. Sistemas Genómicos. Ronda G. Marconi 6, 46980 Paterna (València), Spain.

**María José Escribá Pérez**

Mariajose.escriba@ivirma.com

#### ► RESUMEN

La tecnología de trasplante nuclear se ha aplicado para la mejora de la calidad citoplasmática ovocitaria y para la sustitución mitocondrial completa por spindle transfer. En este contexto, presentamos una nueva aplicación: la generación de embriones androgenotas como una nueva posibilidad para la clonación del gameto paterno. Metodológicamente se basa en la microinyección espermática en ooplastos (ovocitos MII previamente enucleados), cuya ulterior activación permite el desarrollo mitótico uniparental. La validación de este modelo experimental pasa por su caracterización genética (ploidía, fórmula cromosómica y fingerprinting). Adicionalmente, el modelo permite explorar un sistema de edición genómica basado en CRISPR-Cas9 para corregir variantes patogénicas de origen espermático.

**Objetivo:** Validación del modelo androgenota mediante caracterización genética (ploidía, fórmula cromosómica y fingerprinting). Adicionalmente, empleando el modelo androgenota, se explora un sistema de edición genómica basado en CRISPR-Cas9 para corregir variantes patogénicas de origen espermático.

**Materiales y métodos:** Se generaron embriones androgenotas a partir de un paciente heterocigoto para la variante patogénica c.27dupG en el gen HBB responsable de la beta-talasemia y homocigoto para el polimorfismo c.9T>C en el mismo gen. El estudio genético de los androgenotas se realizó en día 3, analizando la ploidía (serie 1; n=6), fórmula cromosómica mediante aCGH (serie 2; n=6) e identidad genética por estudio de polimorfismos STRs (serie 3; n=18), destinando en las fas serie 2 y 3 al menos una célula para control de ploidía mediante FISH. La edición del genoma espermático se realizó coinyectando el espermatozoide con una mezcla de g-RNA, una secuencia de ADN donante de cadena sencilla y CRISPR-Cas9 durante la ICSI. En día 3, los androgenotas fueron analizados por secuenciación para las variantes del gen HBB (serie 4 n=32).

## PREMIO A LA INNOVACIÓN 2021

*Clonación gamética por generación de androgenotas humanas: caracterización genética y edición genómica por CRISPR-Cas9*

**Resultados:** Serie 1: Cada androgenota analizado mostró homogeneidad intra-androgenota en términos de ploidía, con fórmulas 23,X y 23,Y (1:1). Serie 2: El estudio de NGS en androcitos hermanos mostró fórmulas cromosómicas euploides uniformes en 76.2% de los androgenotas, mientras que el 23.4% de los androgenotas fueron no uniformes, presentándose en mosaico (aneuploide/euploide; aneuploidías equilibradas). Serie 3: En total, 86% de los androgenotas mostraron fórmulas haploides 23X o 23Y. Cerca de la mitad de los androgenotas (52,3%) fueron portadores de la variante no patogénica para el alelo HBB y el 47,1%, portadores de aquella patogénica. Además, el análisis individual de los androcitos constituyentes sugiere la existencia de isogenicidad intra-androgenota. El análisis de 18 androcitos demostró dicho evento, no observándose quimerismo intra-androgenota en ningún caso.

Dieciséis androgenotas con información genética completa (ploidía, fórmula cromosómica y estudio de genotipado para HBB) nos permite identificar a posteriori 7 androgenotas haploides con el genotipo no patogénico para el alelo HBB, haploides 23X o 23Y (3:4) sin aneuploidías y presentando el polimorfismo c.9T>C polymorphism.

Serie 4: Tras la coinyección del gRNA, sc-DNA y CRISPR-Cas9 con el espermatozoide, 3/32 androgenotas mostraron c.27dupG (9,4%), siendo 90,6% (29/32) no portadores de la variante patogénica en HBB; un porcentaje llamativamente superior a los controles (52,2%). Tras la secuenciación, observamos 3 grupos de respuesta, en relación a la edición: deleciones (25%), edición ineficiente (polimorfismo c.9T>C persistente; 50%) y edición eficiente (25%).

**Conclusión:** Los androgenotas mostraron la existencia de isogenicidad y autodiploidización, sugiriendo su sentido como tecnología de clonación gamética. El estudio de regiones génicas permitió establecer la segregación de variantes concretas, pudiendo corregirse mediante técnicas de edición genómica y rindiendo células únicas haploides y reparadas, aun con baja eficiencia dados los efectos off-target. Este trabajo presenta un modelo para el estudio del gameto paterno y abre la puerta a la generación preconcepción de células haploides analizadas y/o corregidas, procedentes de varones portadores de enfermedades monogénicas.

**PALABRAS CLAVE:** uniparental haploide, androgenota, isogenicidad, clonación, edición germinal

#### ► ABSTRACT

Nuclear transfer technology has been applied to improve oocyte cytoplasmic quality and complete mitochondrial replacement by spindle transfer. In this context, we present a new application: the generation of androgenotes as a new possibility for cloning the paternal gamete. Methodologically, it is based on sperm microinjection into ooplasts (previously enucleated MII oocytes), whose subsequent activation allows uniparental mitotic development. The validation of this experimental model goes through its genetic characterization (ploidy, chromosomal formula and fingerprinting). Additionally, the model allows exploring a genome editing system based on CRISPR-Cas9 to correct pathogenic variants of sperm origin.

**Objective:** Validation of the androgenetic model through genetic characterization (ploidy, chromosomal formula and fingerprinting). Additionally, using the androgen model, a genome editing system based on CRISPR-Cas9 is explored to correct pathogenic variants of sperm origin.

**Results:** Series 1: Each androgenote showed intra-androgenote homogeneity in terms of ploidy, with formulas 23X and 23Y (1:1). Series 2: NGS study on sister androcytes exhibited uniform haploid chromosome formula in 76.2% euploides and 23.8% aneuploides mosaic (either euploid/aneuploid or equilibrated aneuploid). Series 3: In total, 86% showed chromosome formulas 23X or 23Y. Nearly half of androgenotes (52.9%) carried the wild-type allele for HBB and 47.1% the pathogenic variant. Furthermore, individual analysis of the constituent androcytes suggests the isogenicity within every single androgenote. Single cell analysis in 18 androgenotes showed isogenic cells, without intra-androgenote chimerism.

# PREMIO A LA INNOVACIÓN 2021

Clonación gamética por generación de androgenotas humanas: caracterización genética y edición genómica por CRISPR-Cas9

Sixteen androgenotes with complete genetic information (ploidy, chromosomal formula and HBB study) allow to identify 7 haploid androgenotes, with wild-type genotype for HBB allele and haploid 23X and 23Y (3:4) chromosome endowment. All androgenotes showed the c.9T>C polymorphism.

Series 4: After coinjection of gRNA, sc-DNA and CRISPR-Cas9 with the sperm, 3/32 androgenotes showed c.27dupG (9.4%), with 90.6% not carrying the pathogenic variant in HBB; a strikingly higher percentage than controls (52.9%). After sequencing, we observed 3 response groups, in relation to editing: deletions (25%), inefficient editing (persistent c.9T>C polymorphism; 50%) and efficient editing (25%).

**Conclusion:** Androgenotes showed the existence of isogenicity and autodiploidization, suggesting its meaning as gamete cloning technology. The study of gene regions allowed to establish the segregation of specific variants, which can be corrected by genome editing techniques and yielding single haploid and repaired cells, even with low efficiency given the off-target effects. This work presents a model for the study of the paternal gamete and opens the door to the preconception generation of analyzed and/or corrected haploid cells from male carriers of monogenic diseases.

**KEYWORDS:** haploid uniparental, androgenote, isogenicity, cloning, germline editing

## INTRODUCCIÓN

El androgenota es un constructo uniparental, constituido por un único progenitor, que en el caso particular de estar constituido genéticamente por el espermatozoide, se denomina androgenota.

La condición uniparental, en sí misma, es limitante del desarrollo a término; sin embargo, los estudios en ratón, reportan que es posible la implantación y el desarrollo somático, bajo una condición uniparental diploide, estando restringida a estadios pre-implantación cuando es haploide (McGrath and Soler, 1984).

La posibilidad de emplear la maquinaria ovocitaria para multiplicar la información genética contenida en un núcleo no es novedad (Campbell et al., 1996); numerosos trabajos en distintas especies, incluida la nuestra, han reportado la formación de blastocistos y nacimientos sanos tras el trasplante nuclear a un citoplasma ovocitario competente (Campbell et al., 1996; Tachibana et al., 2009; Hyslop et al., 2016; Costa-Borges et al., 2022).

Dos son las posibles opciones para generar constructos androgenotas. Si bien la enucleación de cigotos correctamente fecundados es una de las opciones más ampliamente utilizadas tanto en ratón como en humanos (Barra and Renard, 1988; Hagemann et al., 1998; Kuznyetsov et al., 2007; Liao et al., 2020); su génesis conlleva la destrucción de un cigoto correc-

tamente fecundado; contraviniendo en sí mismo la ley Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica (preámbulo IV) y referido a la generación de embriones con otros fines a la procreación.

Debido a este imperativo, la opción estratégica de elección fue la enucleación de un ovocito MII y subsiguiente ICSI, en condición monospermica, según la técnica puesta a punto y desarrollada por nuestro equipo de investigación para generar androgenotas haploides (Grau et al., 2011; Escribá et al., 2016). En síntesis, los ovocitos MII son enucleados y posteriormente inseminados con un único espermatozoide. Así, planteamos como primer objetivo, valorar si nuestro método de producción de androgenotas es en sí mismo un método de clonación gamética. Para ello estudiamos los androgenotas en d3, en términos de ploidía, fórmula cromosómica y genotipado. Además, y a fin de explorar posibles usos del modelo androgenota propuesto, como segundo objetivo planteamos si es posible emplear la metodología de producción de androgenotas para editar variantes patogénicas de origen espermático, mediante tecnología de CRISPR-Cas9.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la producción de androgenotas requerimos espermatozoides y óvulos para enuclear, que nos proporcionarán ooplastos (citoplasmas ovocitarios sin identidad genética).

# PREMIO A LA INNOVACIÓN 2021

Clonación gamética por generación de androgenotas humanas: caracterización genética y edición genómica por CRISPR-Cas9

## ORIGEN SEMINAL

Todos los constructos androgenotas, incluidos en este trabajo, se realizaron empleando un mismo origen seminal. Así, identificamos e invitamos participar en el estudio a un varón asintomático para beta talasemia, una dolencia asociada al gen HBB localizado en el brazo corto del cromosoma 11.

La caracterización genética nos confirmó que el varón era portador en heterocigosis de una variante patogénica con-

sistente en un duplicación de una G, concretamente en posición c.27 del gen HBB; siendo además homocigoto para una variante no patogénica, responsable de un polimorfismo posición c.9 (Figura 1a).

El estudio continua con la búsqueda de microsatélites informativos flanqueando la variante y el polimorfismo, y culmina con el estudio de segregación alélica que define los dos haplotipos: en rojo el asociados a la variante y en azul el asociado al wild-type (Figura 1b).

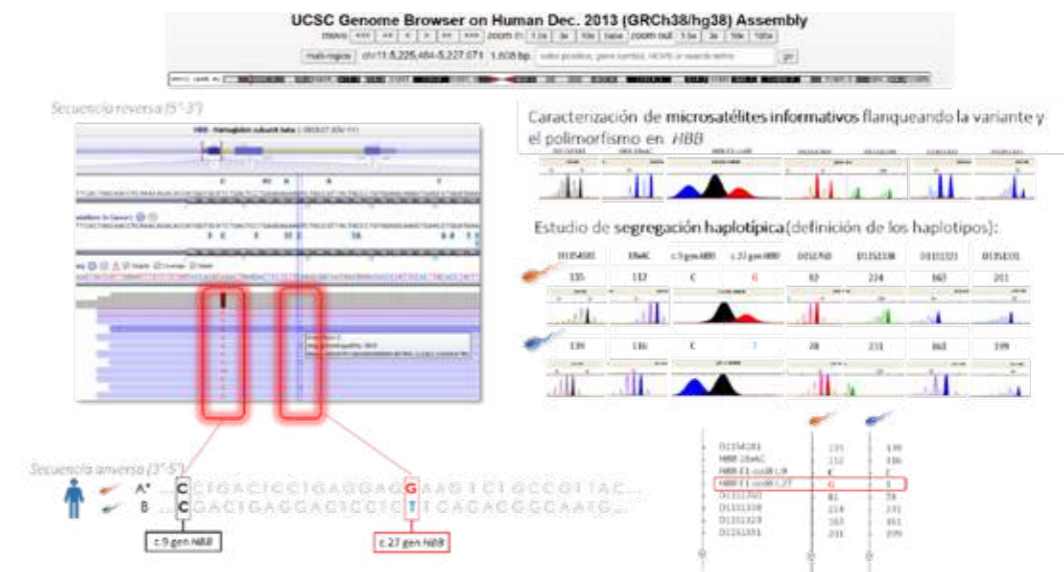


Figura 1. Caracterización genética de un varón heterocigoto para la variante patogénica c.27dupG en el gen HBB responsable de la beta-talasemia y homocigoto para el polimorfismo c.9T>C en el mismo gen (cromosoma 11)

## ORIGEN DE LOS OVOCITOS

Las donantes de ovocitos fueron estimuladas con fines de investigación. Tras protocolos de estimulación ovárica controlada convencional, los ovocitos fueron extraídos mediante punción ovárica y aspirado folicular tras 36 horas de inducción de la ovulación con agonistas. Tras 2 horas de incubación in vitro, los ovocitos fueron aspirados y el grado de maduración constatado. Los ovocitos MII fueron seleccionados para generar ooplastos.

Los ovocitos MII, fueron inspeccionados bajo microscopía con luz polarizada (Oosingt, RI), permitiéndonos la visualización del spindle y, por ende, asumiendo la ubicación de la placa cromosómica. Con ayuda de pipetas de sujeción (o pipeta holding) y pipetas de enucleación (pipeta de CSI), los ovocitos son posicionados hasta a correcta identificación y visualización del huso meiótico. En ese momento y con ayuda de la pipeta de enucleación accedemos al interior citoplasmático, aspirando el spindle, proceso conocido como enucleación y supervisando bajo observación microscópica todo el proceso.

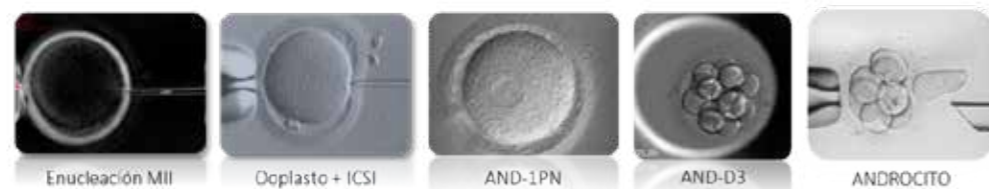
# PREMIO A LA INNOVACIÓN 2021

Clonación gamética por generación de androgenotas humanas: caracterización genética y edición genómica por CRISPR-Cas9

## OBTENCIÓN DE ANDROCITOS

Con esta pérdida de identidad genética por parte del ovocito, los citoplasmas supervivientes (ooplastos) fueron microinyectados con un único espermatozoide, siguiendo el protocolo convencional de ICSI y cultivados en 25  $\mu$ L de GEMS (Genea) en sistema time-lapse (Geri; Merck y Embryoscope, Vitrolife), 37.4°C, 5.5% CO<sub>2</sub>, 21% O<sub>2</sub>, bajo aceite mineral ligero, durante tres días. Tras 16-20 horas de cultivo, los constructos androgenotas fueron identificados como aquellas estructuras con un solo corpúsculo polar (CP), el primero (CP1), y un único pronúcleo. El cultivo ulterior, nos informa del desarrollo, siguiendo

de una cinética rápida de segmentación (Escribá et al, 2016; Figura 2). En ese momento, según el protocolo normalizado de biopsia embrionaria, previa incubación en medio G-PGD suplementado con HSA al 10 % (v/v) (Vitrolife), los androgenotas se desagregan en las células constituyentes; práctica de un agujero en la zona pelúcida mediante aplicación de tres disparos de láser y aspirado amable de cada una de los androcitos con pipetas Humagen destinadas a tal fin. Según este protocolo cada androgenota será desagregado en sus células constituyentes, obteniendo una población de blastómero-like que denominamos androcitos y constituyen la base de nuestro estudio (Figura 2).



**Figura 2.** Representación fotográfica seriada, representando las principales etapas técnicas de obtención de androcitos. Técnicamente, se procede con la enucleación de los ovocitos MI bajo análisis de luz polarizada y ulterior ICSI. Tras 17-20 horas de cultivo (día 1), se evalúa la presencia de un corpúsculo polar y un pronúcleo. El desarrollo ulterior in vitro nos proporciona, en día 3 de desarrollo androgenotas constituidos por una media de 8-10 blastómero-like o androcitos, aislados según la metodología de biopsia embrionaria convencional.

## ESTUDIOS CROMOSÓMICOS

Los análisis de los cromosómicos de los androcitos y, por ende de los androgenotas, fueron realizados mediante FISH, NGS o genotipado, siguiendo los protocolos y el diseño experimental detallados a continuación (Figura 3).

### Determinación de ploidía mediante hibridación in situ fluorescente (FISH, del inglés fluorescent in-situ hybridization)

Cada androcito individual fue fijado con una solución de metanol-ácido acético (3:1) sobre protaobjetos desengrasados. Para el procedimiento FISH, se utilizaron sondas centroméricas para los cromosomas X (Spectrum Green; Vysis), Y (Spectrum Orange; Vysis) y 18 (Spectrum Aqua; Vysis), y sondas específicas de locus para los cromosomas 13 (Spectrum Orange, XXX) y 21 (Espectro Verde, XXX). Las muestras se analizaron con un microscopio de fluorescencia Imager Z2 (Zeiss, Alemania) equipado con un filtro de paso de banda triple para 6-diamino-2-fenilindol/rojo de Texas/isotiocianato de fluoresceína (FITC) y filtros de paso de banda única para FITC, rojo de

Texas, y azul aguamarina. Las imágenes fueron grabadas con una cámara de video Olympus DP-70.

Un androcito se consideró indicativo de ploidía cuando al menos dos autosomas estaban presentes. La ploidía se definió de la siguiente manera: haploide, cuando se identificaba una señal por cromosoma; diploide, cuando se detectaron dos señales; y triploide, cuando eran evidentes tres señales (Figura 3a).

### Análisis de 24 cromosomas por NGS (Next Genome Sequencing)

La preparación de las muestra de androcitos individuales y las pruebas genéticas para aneuploidías se realizaron de acuerdo con protocolos previamente validados (Vendrell et al., 2017). En resumen, cada androcito se incluyó en un tubo PCR de 0,2 ml que contenía 2,5  $\mu$ L de PBS (Cell Signaling Technology, MA, EE. UU.), en condiciones estériles y se almacenó a -20 °C hasta su análisis. La amplificación del genoma completo (WGA) y la construcción de bibliotecas se realizaron con el kit Pico-

# PREMIO A LA INNOVACIÓN 2021

Clonación gamética por generación de androgenotas humanas: caracterización genética y edición genómica por CRISPR-Cas9

plex DNA-Seq (Takara, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las bibliotecas se purificaron, cuantificaron y secuenciaron en una plataforma MiSeq. Los datos de secuenciación se analizaron siguiendo la tecnología desarrollada por Vendrell et al. (2017).

Según los resultados de la NGS, los androcitos se diagnosticaron como: euploides o aneuploides (Figura 3b) y, los androgenotas como uniformes o mosaico, identificando el porcentaje de androcitos con una u otra composición cromosómica.

## GENOTIPADO

Para la identificación de la variante patogénica y aquellas no patogénicas (microsatélites informativos), se procedió a la extracción y purificación de ADN genómico a partir de las muestras de sangre, del donante de semen; realizando una secuenciación Sanger para comprobar la posición de la mutación. De cada androcito, se amplificó el genoma mediante "Sureplex Amplification System" de Illumina®, comprobando la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente, se procedió a la amplificación específica mediante PCR "heminested" de la región donde se encuentra la mutación y de los marcadores microsatélite, utilizando oligonucleótidos fluorescentes. La electroforesis de las muestras y detección fluorescente de los fragmentos obtenidos permitió la minisequenciación de las posiciones donde se encuentran las mutaciones mediante la técnica de SNaPshot. El análisis bioinformático se realizó empleando un software específico. Los haplotipos asociado y no asociado a la mutación han sido establecidos mediante la amplificación específica por PCR de espermatozoides aislados procedentes del varón.

Los posibles resultados serán, androcitos con un resultado de genotipado compatible con el haplotipo portador de la variante patogénica del genotipo salvaje (Figura 3c).

Así mismo, el porcentaje de androcitos con uno u otro genotipo nos informará de la isogenicidad intra-androgenota.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

A fin de abordar el primer objetivo, un total de 45 androgenotas fueron distribuidos en tres series experimentales. En la Serie 1, un total de 6 androgenotas fueron íntegramente analizadas para determinar su ploidía mediante FISH para 5 cromosomas, 13, 18, 21 X e Y pudiendo encontrar fórmulas compatibles con la dotación haploide, diploide o triploide (Figura 3a).

Según la uniformidad en términos de ploidía observada entre androcitos de un mismo constructo, en la serie 2 y serie 3, destinamos un androcito a control de ploidía y los restantes a análisis numérico de cromosomas mediante aCGH o NGS (serie 2, un total de 21 androgenotas). Así encontraremos euploides 23X o 23Y o aneuploides (Figura 3b). En la serie 3, los androcitos de 18 androgenotas fueron analizados a fin de identificar los haplotipos salvaje o portador de la variante patogénica.

Con la información emergente de este primer objetivo, en la serie 4 testamos el sistema de edición genómica espermática mediante tecnología CRISPR-Cas9, recogido como segundo objetivo de este trabajo. Así, siguiendo la metodología descrita por Ma et al. (2017) en el momento del ICSI, el espermatozoide es coinfectado con un coctel de RNA guía, CRISPR, Cas9 y un ADN donante de cadena sencilla. Tras evaluar la condición unipronuclear, los androgenotas fueron cultivados en time lapse hasta d3 de desarrollo; en D3, un androcito es empleado para control de ploidía y el resto del androgenota genotipado. Así, además de los haplotipos wild type y portador, podemos encontrar la secuencia donante (ADN Donor) que excluye la variante patogénica (C>G) e incluye un chivato de edición en posición c.9, revirtiendo el nucleótido en homocigosis a la forma más frecuente (C>T) (Figura 3d).

## RESULTADOS

Este trabajo incluye un total de 168 ovocitos donados a investigación, que fueron enucleados correctamente enucleados (90%) y generando un total de 118 constructos con un único corpúsculo polar y un pronúcleo. El ulterior desarrollo in vitro culminó en día 3 de desarrollo con la producción de 93 androgenotas (79%), conteniendo en promedio 10,2 $\pm$ 3,1 androcitos.

Los resultados de la serie 1 incluyen 6 androgenotas. Todos los androcitos analizados fueron haploides, 23X y 23Y; además, el análisis de los androcitos mostró uniformidad intra-androgenota, siendo todos los androcitos de un mismo androgenota homogéneos en término de ploidía, según los cromosomas analizados. Además, los androgenotas respondieron en ratio 1:1 a fórmulas compatibles con 23,X o 23Y.

En la serie 2, tras estudiar 21 androgenotas, observamos: en primer lugar, que todos los androgenotas fueron haploides tras el análisis de un androcito representativo; en segundo lugar, el 76,2% fueron euploides uniformes, 23X (52,2%) o 23Y (43,7%) y, en tercer lugar, que el 23,8% fue aneuploide

# PREMIO A LA INNOVACIÓN 2021

Clonación gamética por generación de androgenotas humanas: caracterización genética y edición genómica por CRISPR-Cas9

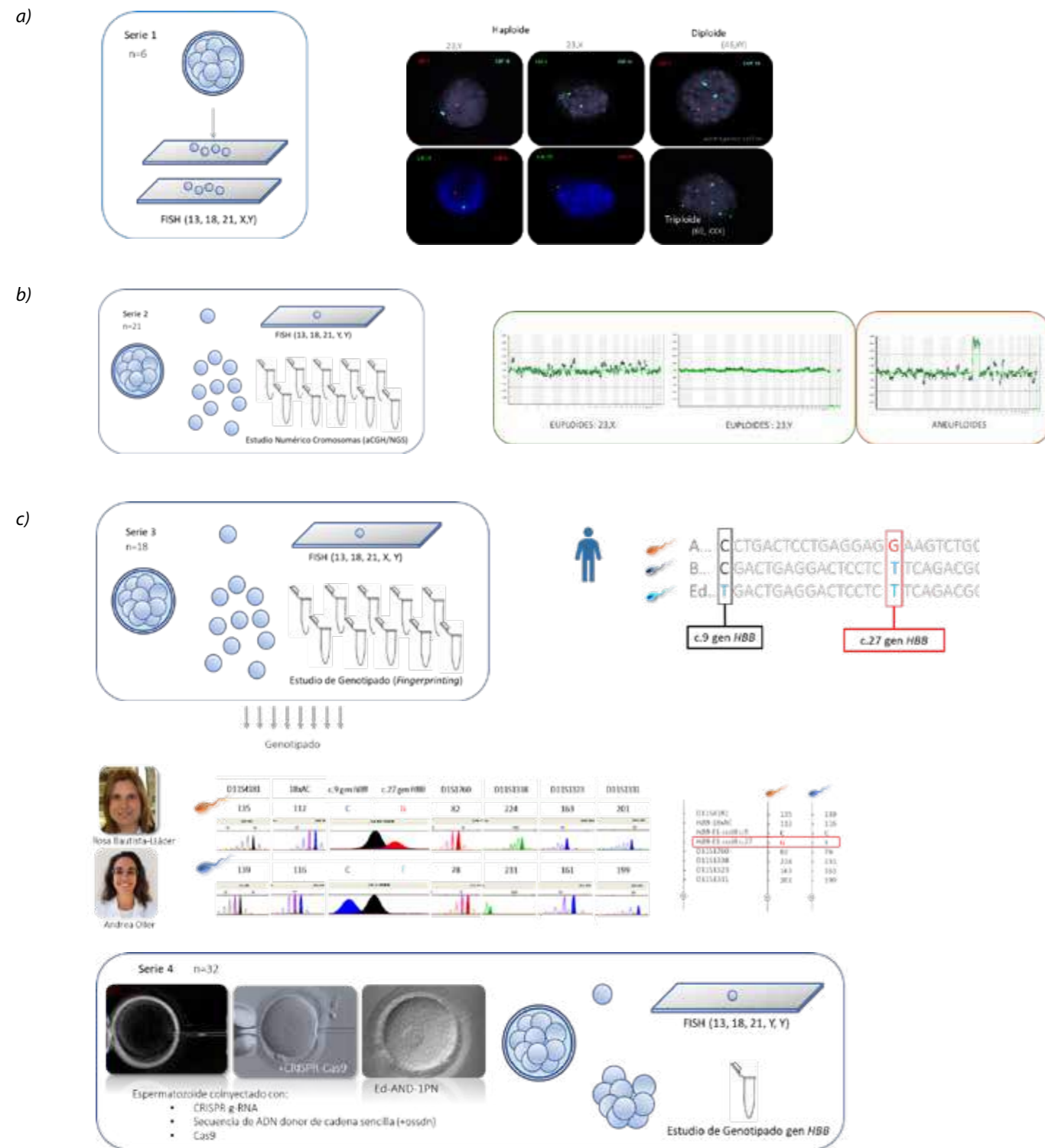


Figura 3. Diseño experimental. Los androcitos fueron estudiados cromosómicamente en términos de ploidía (Serie 1, a), fórmula cromosómica (Serie 2, b), genotipo (Serie 3, c) y genotipado tras la edición por CRISPR-Cas9 (Serie 4, d).

# PREMIO A LA INNOVACIÓN 2021

Clonación gamética por generación de androgenotas humanas: caracterización genética y edición genómica por CRISPR-Cas9

en mosaico (1:1 aneuploide/euploide), todo lo cual sugiere uniformidad intra-androgenota y anomalías numéricas de origen mitótico. Ningún androgenota aneuploide (uniforme o mosaico) fue identificado.

En la serie 3, el análisis de 18 androcitos individuales mostró un 86% de haploides 23X y 23Y presentes en ratio 1:1 y otras fórmulas compatibles con la autodiploidización (46XX, 46YY, 69XXX). Por otra parte, el genotipado mostró que el 52,9% de los androgenotas eran de genotipo salvaje y el otro 47,1% portadores de la variante patogénica. Además, el estudio del conjunto de androcitos mostró isogenicidad intra-androgenota, en términos de genotipo.

Por lo que respecta a los resultados de edición genómica, empleando la tecnología de CRISPR-Cas9, un total de 32 androgenotas fueron analizadas (serie 4). El análisis mediante FISH de un androcito representativo de cada androgenota sugirió que los 32 androgenotas atendían a fórmulas haploides 23X o 23Y, en ratio 1:1. Tras estudiar el genotipado de estos 32 androgenotas, particularmente en la posición c.27, observamos un incremento significativo en la frecuencia del genotipo salvaje frente al patogénico (90,6% vs. 9,4%;  $p < 0.05$ ). El análisis por secuenciación de la posición c.9 (variante no patogénica editada o chivato), observamos un 25% de edición completa, un 50% de quimerismo y un 25% de deleciones.

## DISCUSIÓN

Nuestra estrategia de producción de constructos haploides espermáticos o androgenotas sugiere ser un método de clonación gamética espermática por cuanto los androcitos constituyentes, en promedio 10, presentan isogenicidad aun con eventos de autodiploidización.

Los resultados obtenidos sugieren que, si bien los resultados son iniciales, la corrección de variantes concretas en espermatozoides es posible mediante técnicas de edición genómica, rindiendo células únicas haploides y reparadas aunque con baja eficiencia, dados los efectos no deseados.

En síntesis, nuestro procedimiento de producción de androgenotas es un método por el que tras cambiar el formato de un espermatozoide a una estructura embryo-like, llamada androgenota, hemos constatado que sus células constituyentes o androcitos son idénticas, en los términos estudiados. Entre las aplicaciones, destacaría el estudio del gameto

paterno, y la posibilidad de seleccionar un genotipo, empleando el excedente para la reconstrucción de la dotación diploide heteroparental como ocurrió en otras especies.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al ISCIII, por financiar la ejecución de este proyecto (PI19/00577). A los compañeros embriólogos y técnicos de IVI Valencia y Sistemas Genómicos.

## BIBLIOGRAFÍA

Barra J, Renard JP 1988 Diploid mouse embryos constructed at the late 2-cell stage from haploid parthenotes and androgenotes can develop to term. *Development* 102, 773–779.

Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*. 1996 Mar 7;380(6569):64-6.

Costa-Borges N, Spath K, Miguel-Escalada I, Mestres E, Balmaseda R, Serafín A, García-Jiménez M, Vanrell I, González J, Rink K, Wells D, Calderón G. Maternal spindle transfer overcomes embryo developmental arrest caused by ooplasmic defects in mice. *Elife*. 2020 Apr 29;9:e48591.

Escribá MJ, Escrich L, Galiana Y, Grau N, Galán A, Pellicer A. Kinetics of the early development of uniparental human haploid embryos. *Fertil Steril* 2016; 105:1360–68.e1.

Grau N, Escrich L, Albert C, Delgado A, de los Santos MJ, Escribá MJ. 2011. Comparison of two methodologies of oocyte enucleation. *Fertility and Sterility* 96: S246. DOI:https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.07.948

Hagemann LJ, Peterson AJ, Weilert LL et al. 1998 In vitro and early in vivo development of sheep gynogenones and putative androgenones. *Molecular Reproduction and Development* 50, 154–162.

Hyslop, L. A. et al. Towards clinical application of pronuclear transfer to prevent mitochondrial DNA disease. *Nature* 534, 383–386 (2016).

Kuznyetsov V, Kuznyetsova I, Chmura M, Verlinsky Y. Duplication of the sperm genome by human androgenetic embryo production: towards testing the paternal genome prior to fer-

# PREMIO A LA INNOVACIÓN 2021

Clonación gamética por generación de androgenotas humanas: caracterización genética y edición genómica por CRISPR-Cas9

tilization. *Reprod Biomed Online*. 2007 Apr;14(4):504-14.

Liao C, Shen X, Zhang Y, Lei L. Ratio of the zygote cytoplasm to the paternal genome affects the reprogramming and developmental efficiency of androgenetic embryos. *Molecular Reproduction and Development* 2020;87(4):493-502.

Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW, Wu J, Lee Y, Suzuki K, Koski A, Ji D, Hayama T, Ahmed R, Darby H, Van Dyken C, Li Y, Kang E, Park AR, Kim D, Kim ST, Gong J, Gu Y, Xu X, Battaglia D, Krieg SA, Lee DM, Wu DH, Wolf DP, Heitner SB, Belmonte JCI, Amato P, Kim JS, Kaul S, Mitalipov S. 2017. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*. 24;548(7668):413-419.

McGrath J, Solter D. 1984. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell*. 37(1):179-83.

Tachibana, M. et al. Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature* 461, 367–372 (2009).

Vendrell X, Fernández-Pedrosa V, Triviño JC, Bautista-Llácer R, Collado C, Rodríguez O, et al. New protocol based on massive parallel sequencing for aneuploidy screening of preimplantation human embryos. *Syst Biol Reprod Med* 2017; 63:162–78

## CONTROL EN SALAS DE CRIOBIOLOGIA



MONITORES DE OXÍGENO Y CO2



RACKS PARA GOBELETS CON ACCESO LATERAL Y PARA BOLSAS DE SANGRE



CONTROL DE NIVEL Y TEMPERATURA "INALÁMBRICO"



Xarol, 34B - P.I. Les Guixeres - 08915 - BADALONA | T. 933 847 116 | [www.cryogas.es](http://www.cryogas.es) | [cryo@cryogas.es](mailto:cryo@cryogas.es)

## AULA JOVEN

### POTENCIAL DE LA CLONACIÓN: DESDE HERRAMIENTA TERAPÉUTICA Y GANADERA HASTA TRATAMIENTO DE LA INFERTILIDAD

#### CLONING POTENTIAL: FROM THERAPEUTIC AND LIVESTOCK TOOLS TO INFERTILITY TREATMENT

**Alexandra Soto y Alejandra Conde**

Estudiantes del Máster Universitario en Biotecnología de la Reproducción Humana Asistida de la Universitat de València

Centro de formación IVI Learning Center. Calle Guillem de Castro, 9, 46007 València

Email: [alexandrasoto1998@gmail.com](mailto:alexandrasoto1998@gmail.com)

#### ► RESUMEN

Hace más de un siglo, el ser humano logró llevar a cabo por primera vez la clonación de un animal separando las células que conformaban un embrión. A partir de ahí, fueron diversos los intentos de desarrollar nuevas técnicas con las que poder realizar la clonación de diferentes especies con una mayor eficacia. Así, en 1997 se anunció el nacimiento de Dolly, la primera oveja clonada por transferencia nuclear de células somáticas (SCNT). Desde entonces, se han tratado de mejorar los protocolos de clonación existentes, ya que sigue siendo un proceso muy ineficiente y que genera ciertas consecuencias en la descendencia obtenida, además de relacionarse con elevadas tasas de aborto. Sin embargo, la transferencia nuclear es una herramienta cada vez más utilizada, ya que cuenta con múltiples aplicaciones tales como la propagación de genomas valiosos, la preservación de especies en peligro de extinción, la generación de animales transgénicos o la obtención de células madre para terapia, entre otras. Por tanto, el presente trabajo ofrece una visión general de las diferentes técnicas de clonación y sus aspectos más relevantes, deficiencias y mejoras, sus aplicaciones y la situación actual a nivel legislativo.

**Palabras clave:** clonación de organismos, técnicas de transferencia nuclear, reprogramación celular, ovocito.

#### ► ABSTRACT

More than a century ago, humans succeeded in cloning an animal for the first time by separating the cells that made up an embryo. Since then, several attempts have been made to develop new techniques to clone different species more effectively. In 1997 was the birth of Dolly, the first sheep cloned by somatic cell nuclear transfer (SCNT). Since then, attempts have been made to improve existing cloning protocols, as it is still a very inefficient process and has certain consequences for the offspring obtained, as well as being associated with high rates of miscarriage. However, nuclear transfer is an increasingly used tool, as it has multiple applications such as the propagation of valuable genomes, the preservation of endangered species, the generation of transgenic animals or obtaining stem cells for therapy, among others. Therefore, this paper provides an overview of the different cloning techniques and their most relevant aspects, shortcomings and improvements, their applications and the current legislative situation.

**Keywords:** cloning (organisms), somatic cell nuclear transfer technique, cellular reprogramming, oocyte.

## 1. INTRODUCCIÓN

Entendemos por clonación la producción de copias genéticamente idénticas de un organismo pluricelular completo (Keefer, 2015; Rahbaran et al., 2021). Desde hace cientos de años, el ser humano ha intentado replicar los modelos de clonación natural que observaba en la naturaleza. De este modo, ya en 1902, Spemann trató de generar gemelos artificialmente. Para ello, obtuvo un embrión de salamandra en estadio de dos células, llamadas blastómeras, y lo apretó con un cabello de bebé hasta separarlas, consiguiendo generar un individuo adulto a partir de cada una de ellas (Spemann, 1901). Años más tarde, Willadsen demostró que también era posible obtener gemelos de grandes mamíferos dividiendo a la mitad embriones en estadio de mórula o blastocisto por medio de micromanipulación (Willadsen et al., 1981). No obstante, el mayor alcance de la clonación se logró con el desarrollo de la transferencia nuclear (NT, Nuclear Transfer), que consiste en la transferencia del núcleo de una célula donante a un ambiente receptor previamente enucleado, que puede ser un ovocito, un cigoto e incluso una blastómera (Polejaeva, 2021). Así, gracias a esta técnica, Wilmut consiguió reportar el nacimiento de la oveja Dolly, el primer organismo clonado por transferencia nuclear de células somáticas, SCNT (Somatic Cell Nuclear Transfer), utilizando células somáticas adultas obtenidas de una glándula mamaria (Wilmut et al., 1997). Desde entonces, esta técnica se ha empleado para la clonación de múltiples especies con éxito, ya que arroja una gran cantidad de ventajas y aplicaciones, como la propagación de genomas valiosos (especímenes de élite y sementales o ganado muy productivo), la clonación post mórtem y de animales infértiles o castrados, la clonación de especies en peligro de extinción, la generación de animales modificados genéticamente para la producción de determinados subproductos y la clonación terapéutica para el aislamiento de células madre (Keefer, 2015; Moore and Hasler, 2017; Rahbaran et al., 2021), entre otros. No obstante, a pesar de las diversas aplicaciones, la clonación sigue siendo un proceso muy costoso (unos 15000€ por animal) e ineficiente, ya que solo alrededor del 5% de los embriones transferidos dan lugar a nacidos vivos, sanos y productivos, lo que ha limitado en gran medida el empleo de esta tecnología (Hasler, 2014; Moore and Hasler, 2017).

Por tanto, el objetivo de esta revisión es sintetizar y describir las diferentes técnicas de clonación existentes, así como los factores que influyen en ellas, ofreciendo una visión general y actualizada de sus múltiples aplicaciones y del marco legal que las ampara.

## 2. TIPOS Y TÉCNICAS DE CLONACIÓN

Existen dos tipos básicos de clonación: la clonación sin reprogramación, en la que no se produce la alteración del desarrollo en curso del embrión (Escribá et al., 2002); y la clonación con reprogramación, basada en la transferencia nuclear.

### CLONACIÓN EMBRIONARIA SIN REPROGRAMACIÓN

Se trata de una técnica sencilla y que no requiere un equipo costoso, basada en la división embrionaria. En función del estadio en el que se divida el embrión, puede ser de dos tipos:

- a) **Desagregación embrionaria**, también conocida como división embrionaria en etapa de escisión, que consiste en la formación de gemelos, tripletes o cuádruples al dividir un embrión en etapas de 2 a 8 células. Cada una de estas células o blastómeras son totipotentes, por lo que tienen la capacidad de generar un organismo completo al insertarse en una zona pelúcida (ZP) previamente evacuada (Rahbaran et al., 2021), tal y como se muestra en la Figura 1. La eficiencia del proceso disminuye a medida que se producen más múltiples, debido al menor número de blastómeras presentes en el momento de la compactación y de la blastulación, así como a la pérdida de volumen citoplasmático (Escribá et al., 2002). La formación de blastocistos ocurre en un horario temporal, independientemente del número de células que conformen el embrión en ese momento. Si desagregamos un embrión en estadio de 8 células en blastómeras individuales, no habrá masa crítica suficiente para decidir qué células darán lugar a la masa celular interna (MCI) y cuales al trofoectodermo. Si el número de células presentes para formar la MCI es inadecuado, se genera una estructura denominada vesícula trofoblástica, compuesta únicamente por trofoectodermo, que no es viable (Escribá et al., 2002). Para superar esta limitación, se ha demostrado que es posible obtener descendencia viva en primates al desagregar un embrión en estadio de 8 células y transferirlas por pares a una ZP evacuada, con tasas de nacido vivo del 8% frente al 40% de los controles procedentes de fecundación in vitro (FIV) (Chan et al., 2000).
- b) **Splitting embrionario o bipartición de embriones**, que consiste en dividir mecánicamente a la mitad un embrión en estado de mórula o de blastocisto por medio

de una microcuchilla, asegurándose que se reparte equitativamente la masa celular interna y el trofoectodermo a cada una de las mitades (Figura 2). En este caso, únicamente se pueden obtener dos réplicas por cada embrión, por lo que es una forma de generar gemelos artificialmente (Escribá et al., 2002; Casser et al., 2019; Rahbaran et al., 2021). Una de las principales desventajas de esta técnica es que resulta bastante invasiva para el embrión, ya que, a la hora de generar el corte, algunas de las células se destruyen, pudiendo disminuir su potencial de desarrollo (Skrzyszowska and Samiec, 2021).

Respecto a la eficiencia de la clonación por estas técnicas, se han observado diferencias en función del estadio embrionario utilizado, e incluso se han obtenido distintos resultados empleando la misma etapa en diferentes especies, por lo que el potencial de desarrollo tras la manipulación depende de cada una de ellas. En ganado bovino, la tasa de gestación por transferencia de un embrión completo es de alrededor del 70%, mientras que para un hemiembrión es del 50-55%, por lo que la técnica proporciona un aumento de casi el 40% en la posibilidad de concepción (Noli et al., 2017). Por ejemplo, realizando la técnica de bisección en 18 embriones de oveja, se transfirieron un total de 36 hemiembriones que resultaron en 25 nacidos vivos, obteniéndose una eficiencia del proceso del 138,9% (Casser et al., 2019). En embriones humanos, se estudió la calidad de los blastocistos obtenidos por desagregación de blastómeras. Se observó que el potencial de expansión del blastocisto y la prevalencia de aneuploidías y mosaicismos no se vieron afectados por la división embrionaria, aunque los embriones obtenidos presentaban una morfocinética alterada y un menor tamaño y calidad respecto a los controles no manipulados. De los embriones divididos, el 69% se desarrollaron hasta blastocisto expandido, frente al 87,5% en los controles ( $p > 0,05$ ), por lo que la tasa de supervivencia alcanzada es alta (Omidi et al., 2020).

### CLONACIÓN EMBRIONARIA CON REPROGRAMACIÓN

La clonación por transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) elimina la necesidad de que el material genético provenga de una célula germinal, pudiendo usarse en su lugar células somáticas como fibroblastos, células del cúmulo o células de Sertoli, entre otras (Wisely et al., 2015; Czernik et al., 2019). Para llevarla a cabo, se requiere un ovocito receptor, al que se le retira previamente el núcleo para convertirse en un recipiente celular que albergará el genoma diploide a clonar; y un núcleo donante, que será la célula somática

que se inserte en el ovocito (Wisely et al., 2015). Los pasos seguidos para realizar la SCNT son los siguientes (Figura 3):

- I. **Enucleación del ambiente receptor.** Pueden utilizarse como receptores ovocitos en diferentes estadios madurativos, como vesícula germinal (VG) (Bui et al., 2008), metafase I (MI) o metafase II (MII) (Mullins et al., 2004), así como cigotos (Greda et al., 2006). No obstante, el ambiente receptor por excelencia es el ovocito MII, puesto que tiene una mayor capacidad para reprogramar las células somáticas a la totipotencia (Narbonne et al., 2012; Simões and Rodrigues Santos, 2017). Existen diferentes métodos para la enucleación de los ovocitos, aunque los más utilizados son: la enucleación usando como guía la posición del primer corpúsculo polar (CP) (con o sin tinción con Hoechst 33342) (Hardarson et al., 2000; Li et al., 2004), la enucleación con microscopio de luz polarizada (PolScope) (Liu et al., 2000), la enucleación química y la bisección de ovocitos (Li et al., 2004).
- II. **Transferencia del núcleo donante.** Una vez enucleado el ambiente receptor, se lleva a cabo la transferencia del núcleo donante a su interior. Existen tres formas distintas: empleando polietilenglicol (PEG) (Yang and Shen, 2006), mediante electrofusión (Qu et al., 2020) y utilizando el virus Sendai inactivado (Gouveia et al., 2020), siendo este último el método más utilizado, ya que no produce la activación espontánea de los ovocitos, y además se obtienen mayores tasas de blastulación y calidad embrionaria (Song et al., 2011). Por otro lado, es de gran importancia la sincronía de los ciclos celulares del núcleo donante y del ovocito receptor para que tenga lugar una correcta reprogramación celular y con ello el éxito de la clonación. Es habitual el empleo del ovocito en metafase II activado, ya que, debido a su actividad MPF (factor promotor de la maduración) reducida, acepta núcleos en cualquier fase del ciclo celular, considerándose así un receptor universal (Polejaeva, 2021). No obstante, su capacidad reprogramadora es limitada, por lo que tienden a emplearse ovocitos no activados con núcleos donantes en G1/G0 (por ejemplo, células epiteliales o neuronas, respectivamente) cuando se requiere una mayor reprogramación nuclear. En caso de usarse núcleos en fase S o G2, pueden producirse aneuploidias que dan lugar a una clonación ineficiente.
- III. **Activación de los ovocitos.** De forma natural, tras la fecundación del ovocito por el espermatozoide, la fosfolipasa C zeta (PLC $\zeta$ ) espermática induce una elevación de los niveles de calcio intracelulares, promoviendo la des-

## AULA JOVEN

Potencial de la clonación: desde herramienta terapéutica y ganadera hasta tratamiento de la infertilidad

composición del MPF y la activación del ovocito. Dado que PLC $\zeta$  no está presente en las células somáticas, es necesario inducir la activación artificialmente (Matoba and Zhang, 2018). Existen distintos métodos de activación ovocitaria, como la ionomicina o la 6-dimetilaminopurina (6-DMAP), aunque cabe destacar que la eficiencia de cada uno depende de la especie en la que se realice la transferencia nuclear.

**IV. Cultivo de los constructos.** Varios estudios han demostrado que los embriones reconstruidos por SCNT son menos competentes que los procedentes FIV (Cordova et al., 2017). Por ello, es esencial establecer y optimizar medios de cultivo específicos para cada tipo celular y especie. No obstante, actualmente la composición ideal de estos medios sigue siendo desconocida, por lo que en muchas ocasiones se lleva a cabo la transferencia embrionaria inmediatamente después de la transferencia nuclear, disminuyendo la eficiencia del proceso.

### 3. DEFICIENCIAS Y CONSECUENCIAS DE LA CLONACIÓN SOMÁTICA

#### REPROGRAMACIÓN NUCLEAR INCOMPLETA, ACTIVACIÓN EMBRIONARIA Y HETEROPLASMA

La SCNT es un proceso con baja eficiencia debido a una serie de problemas tales como: abortos tempranos y tardíos, sistemas inmunitarios comprometidos, problemas circulatorios y respiratorios de las crías y un alto nivel de muerte fetal, probablemente mediada por una reprogramación epigenética atípica (Hildebrandt et al., 2021). Solo una pequeña proporción de animales derivados de transferencia embrionaria de embriones clonados se desarrollan en descendencia normal (1-5%) (Wilmut et al., 2015). El número significativo de embriones que mueren durante la gestación se debe principalmente a anomalías en la placenta (Watanabe and Nagai, 2009) o a un crecimiento anormal del feto, conocido como síndrome de la descendencia grande (Keefer, 2015). Estos fenotipos anormales derivan de una reprogramación nuclear (NR, Nuclear Reprogramming) incompleta del núcleo donante en el ovocito receptor. La reprogramación nuclear supone la reversión del epigenoma establecido durante la diferenciación celular, y es normalmente conferida por los factores de reprogramación intrínsecos del ovocito. Una NR completa restaura la condición de totipotencia permitiendo que el clon obtenido por SCNT se desarrolle en un adulto normal. La persistencia de marcas epigenéticas en

el genoma del núcleo donante somático hace que genes cruciales para el desarrollo sean inaccesibles para su transcripción, llevando en algunos casos a patrones de expresión génica anormales y, por tanto, anomalías en la placenta y lo que ello conlleva (Loi et al., 2016). Por otro lado, una combinación de genes nucleares y mitocondriales controlan la función mitocondrial, por lo que es esencial una correcta comunicación entre el ADN mitocondrial (ADNmt) y genómico para un desarrollo adecuado (Loi et al., 2011). La heteroplasma (presencia de distintos haplotipos mitocondriales en una misma célula) plantea ciertos problemas como la incompatibilidad de genes del ADNmt y el ADN genómico, y la posibilidad de que el ADNmt de la célula donante pueda causar un pobre desarrollo de los embriones clonados (Wisely et al., 2015).

#### ENDOGAMIA

La depresión endogámica, es decir, la pérdida de la capacidad de adaptación a nuevas situaciones debido a la pérdida de variación genética por homocigosidad, puede ser uno de los resultados del uso de la clonación somática en animales tanto en el ámbito ganadero como en la protección de especies y clonación de mascotas, además de su asociación a alelos raros y deletéreos (Holt et al., 2004). Clonar individuos pone la variabilidad genética en duda, sin embargo, no se ha estudiado experimentalmente (Czernik et al., 2019).

### 4. MEJORA DE LAS TÉCNICAS

Para evitar anomalías en las modificaciones epigenéticas que impidan la correcta reprogramación nuclear se han propuesto una serie de mejoras, como el tratamiento con inhibidores de las deacetilasas de histonas de clase I y II, como la tricostatina, ya que la deacetilación de histonas supone una menor apertura de la cromatina, que compromete la transcripción génica para la activación del embrión (Czernik et al., 2019). Otra de estas mejoras es impedir la expresión del ARN no codificante Xist que se transcribe del cromosoma X silenciado y que es uno de los principales indicadores de la condición de inactivación del cromosoma X. Usando núcleos donantes en los que se ha eliminado Xist para prevenir su expresión y el silenciamiento de un cromosoma X, mejoró el desarrollo embrionario de clones masculinos en 7-8 veces comparado con el procedimiento normal en ratones (Matoba et al., 2011). Por otro lado, la inyección de ARN mensajero de desmetilasa de histonas mejora el desarrollo a término de embriones de ratón y macaco en ambos

## AULA JOVEN

Potencial de la clonación: desde herramienta terapéutica y ganadera hasta tratamiento de la infertilidad

sexos, dado que la metilación de las histonas se asocia con la represión de la transcripción de la mayoría de los genes (Matoba et al., 2014). Otra opción es el tratamiento con ácido ascórbico, que supone una mejora en la eficiencia de la reprogramación de las células somáticas en células pluripotentes (Czernik et al., 2019). Por último, la expresión exógena del gen de la protamina 1 (Prm1) en el núcleo donante, con el fin de mimetizar al máximo la acción del espermatozoide en la activación ovocitaria, es otra de las mejoras que se proponen (Czernik et al., 2019).

### 5. APLICACIONES DE LA CLONACIÓN SOMÁTICA

#### CLONACIÓN CON FINES TERAPÉUTICOS

Una de las principales aplicaciones de la SCNT con finalidad terapéutica es la generación de embriones para el aislamiento de células madre embrionarias (ESC), aunque los intentos de derivación y propagación de ESC pluripotentes de animales ungulados (vacas, cerdos, cabras, etc.) siguen sin tener éxito hasta la fecha. La creación de líneas de ESC permitiría la producción de ganado genéticamente superior a través de la selección y edición del genoma, y la creación de modelos transgénicos para enfermedades humanas (Blomberg and Telugu, 2012). Para socavar la limitación del bajo rendimiento en la obtención de ESC de ganado, se ha planteado la generación de células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Para ello, es necesario reprogramar las células somáticas a un estado de pluripotencia, lo cual se puede lograr con el uso de los factores de Yamanaka, la transgénesis con retrovirus, vectores episomales, productos químicos, proteínas e incluso ARN mensajero (ARNm) (Meir and Li, 2021). La investigación en iPSC de origen porcino es de gran relevancia, ya que, debido a su similitud con los humanos, hace que sean un modelo ideal para el tratamiento de enfermedades humanas (Su et al., 2020). Su et al. generaron iPSC a partir de células madre mesenquimales bovinas que se emplearon para NT como núcleos donantes, obteniéndose una tasa de formación de blastocistos del 24,5%. También se ha conseguido el nacimiento de corderos quiméricos procedentes de iPSC ovinas derivadas de fibroblastos embrionarios de ovejas (Sartori et al., 2012). Finalmente, en el caso de los caballos, la generación de iPSC equinas son de gran importancia como herramienta terapéutica para el tratamiento de lesiones musculoesqueléticas, frecuentes en caballos de competición (Su et al., 2020).

#### GENERACIÓN DE ANIMALES TRANSGÉNICOS

La SCNT junto con la modificación genética permite la producción de descendencia transgénica habiendo realizado previamente una selección y caracterización de las células donantes. De este modo, se asegura que las crías contendrán y expresarán el transgén de interés (Keefer, 2015). La aplicación de la transgénesis y la clonación para la generación de ganado altamente productivo es de gran importancia para poder cubrir las futuras necesidades alimenticias de la población. Las investigaciones actuales se han centrado en la generación de animales resistentes a enfermedades, productores de alimentos libres de alérgenos u otras sustancias de interés, y otros tipos de modificaciones para el bienestar animal. Por ejemplo, se ha conseguido producir ganado bovino resistente a la tuberculosis, vacas productoras de leche sin lactosa y ganado sin cuernos. Más recientemente, se ha aplicado la tecnología de CRISPR-Cas9 para crear cerdos resistentes al virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (Jabbar et al., 2021), e incluso, en el último año, se han conseguido obtener anticuerpos policlonales heterólogos frente al SARS-CoV-2 en cerdos humanizados procedentes de SCNT (Vanhove et al., 2021).

#### CLONACIÓN DE ESPECIES EN PELIGRO DE EXTINCIÓN

Dada la dificultad en la obtención de ovocitos de especies en peligro de extinción, la clonación para su conservación ha llevado al uso de la clonación somática interespecífica (iSCNT), donde los núcleos donantes y los ambientes receptores provienen de especies diferentes, siendo los citoplasmas receptores procedentes de especies más comunes y que se encuentran estrechamente relacionadas filogenéticamente con la especie en peligro que se desea clonar. Sin embargo, también se ha planteado la clonación somática entre especies más separadas, aunque los resultados no han sido prometedores (Wisely et al., 2015; Mrowiec et al., 2021). La aplicación exitosa de iSCNT, resultando en descendencia viva, se confirmó en multitud de combinaciones de especies estrechamente relacionadas, como el gaur o bisonte de la India con vacuno (Lanza et al., 2000), el banteng con vacuno (Sansinena et al., 2005), el muflón con oveja (Loi et al., 2001) o el gato salvaje africano con gato doméstico (Gómez et al., 2004), entre otros. Un aspecto interesante en torno a la clonación de especies en peligro sería el establecimiento de bancos de genes, esto es, bancos genéticos que incluyan gametos y líneas celulares somáticas, que permitan la preservación de un pool genético que podría ser usado para reestablecer o expandir las poblaciones amenazadas gracias a las técnicas de SCNT o iSCNT (Mrowiec et al., 2021).



## CLONACIÓN DE MASCOTAS

Respecto a la clonación de mascotas convencionales, en el año 2005 se logró el nacimiento del primer perro clonado, Snuppy, utilizando fibroblastos del oído de un lebrón afgano de 3 años, y un labrador retriever como hembra gestante (Lee et al., 2005). Desde entonces, se han clonado con éxito diferentes razas de perro, e incluso se han fundado múltiples empresas dedicadas a la clonación de mascotas.

## 6. SITUACIÓN ACTUAL DE LA LEGISLACIÓN DE LA CLONACIÓN

Actualmente, la clonación cuenta con múltiples aplicaciones en campos muy distintos, por lo que es lógico pensar que son necesarias una serie de leyes que regulen estas técnicas. No obstante, cabe destacar que la legislación es muy diferente en cada país y varía según la finalidad de la técnica empleada. La clonación humana con fines reproductivos está prohibida internacionalmente desde el año 1997, a raíz de la determinación de la UNESCO (Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia, y la Cultura) tras conocer la noticia de la oveja Dolly. Mientras que esta decisión ha sido unánime, existe mucha discrepancia respecto a la clonación con fines terapéuticos. En España, la ley 1/2007 del 16 de marzo regula la investigación en reprogramación celular con finalidad exclusivamente terapéutica. Es esta, se aprueba el empleo de la transferencia y reprogramación celular para la obtención de células madre embrionarias procedentes de la masa celular interna de un embrión preimplantatorio en estadio de blastocisto, estando totalmente prohibida la transferencia de estos embriones a una mujer. Aunque algunos otros países de la unión europea aprueban la clonación terapéutica, la gran mayoría únicamente permiten la investigación con células madre embrionarias extraídas de embriones supernumerarios (aquellos sobrantes de un tratamiento de reproducción asistida), pero prohíben la SCNT.

Respecto a la legislación de la clonación de ganado, el 3 de septiembre de 2021, el Parlamento Europeo aprobó una resolución para la prohibición de la clonación de animales destinados a fines alimentarios, así como la imposición de un embargo en las importaciones de animales clonados, sus crías y productos derivados. En cambio, en EE. UU., la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) aprobó ya en el año 2008 el uso de especímenes clonados para la alimentación humana y animal. No obstante, los altos costes de producción y las bajas eficiencias, hace que la mayoría de los ganaderos empleen únicamente esta técnica con fines reproductivos para la obtención de descendencia, y no directamente para su consumo (Keefer, 2015).

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Además de las múltiples aplicaciones terapéuticas y en la industria ganadera, se ha planteado el uso de las técnicas de clonación como tratamiento de infertilidad en humanos. Así, en el año 2004, el Comité de Ética de la Sociedad Estadounidense de Medicina Reproductiva (ASRM) se mostró a favor del empleo del splitting embrionario con el objetivo de conseguir un solo embarazo (Noli et al., 2017). Este enfoque consistiría en dividir a la mitad un blastocisto de buena calidad obteniendo dos embriones genéticamente iguales. De este modo, en la primera transferencia únicamente se transferiría uno de ellos, mientras que el embrión restante se vitrificaría, pudiendo ser utilizado en caso de que no se consiguiese gestación. Este planteamiento no tendría por qué acarrear problemas éticos siempre y cuando no se transfiriesen ambos embriones, ya que entonces se estaría realizando una clonación. Además, el embrión vitrificado podría ser empleado para un diagnóstico genético o como fuente de células madre. Esto podría ser muy útil tanto en pacientes con baja reserva ovárica como en mujeres de edad avanzada, puesto que se duplicarían las posibilidades de conseguir un embarazo, a la vez que se reducirían el número de ciclos y estimulaciones a las que tendrían que someterse. A pesar de todo, esta técnica sigue siendo controvertida y ha suscitado numerosas objeciones éticas y morales, de modo que, para poder trasladarla a clínica, sería necesario una ley estricta que la controlase para evitar un mal uso de la misma.

## 8. CONCLUSIONES

A pesar de que el término de clonación sigue sonando actualmente a ciencia ficción, cada vez está más cerca de convertirse en una herramienta rutinaria de trabajo. Como se ha mostrado a lo largo de la revisión, las técnicas de transferencia nuclear se emplean desde hace décadas en múltiples sectores, aunque con bajas eficiencias y altos costes. Por tanto, es necesario seguir investigando para mejorar los protocolos de clonación existentes y conseguir aumentar el rendimiento del proceso, estudiando en detalle la salud de la descendencia obtenida. Además, sería interesante estudiar a fondo el empleo del splitting embrionario como posible tratamiento de infertilidad, siendo necesaria una ley exhaustiva y exigente que regulase dicho procedimiento.

## 9. AGRADECIMIENTOS

A M<sup>a</sup> José Escribá y M<sup>a</sup> Fernanda Insua por sus recomendaciones, apoyo e interés en esta revisión.

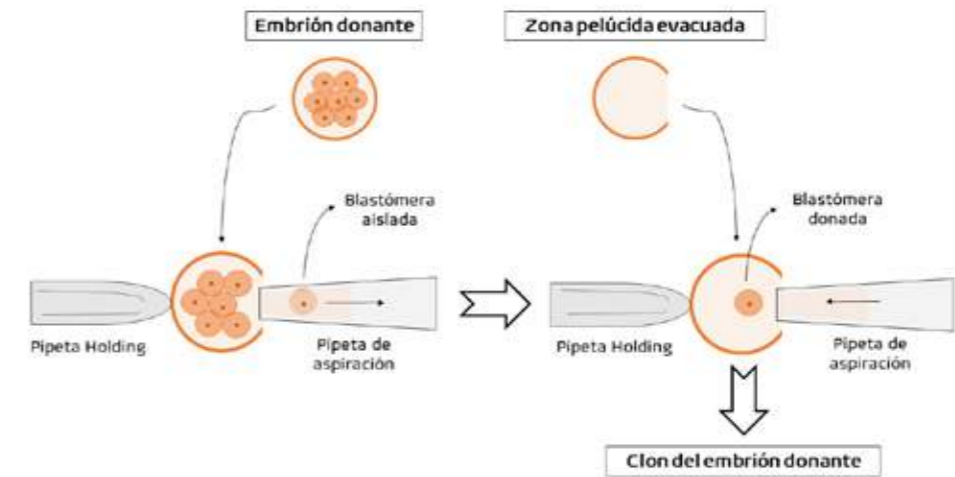


Figura 1. Pasos del proceso de desagregación embrionaria.

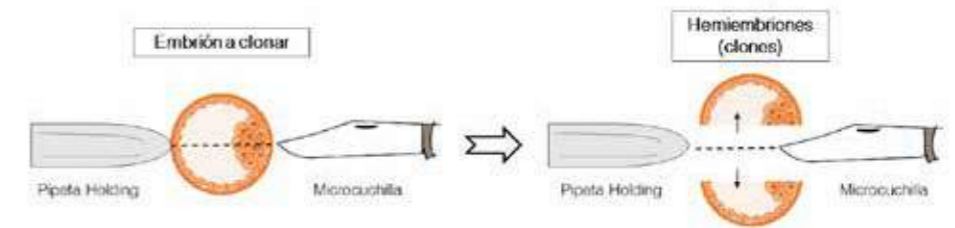


Figura 2. Proceso de splitting embrionario.

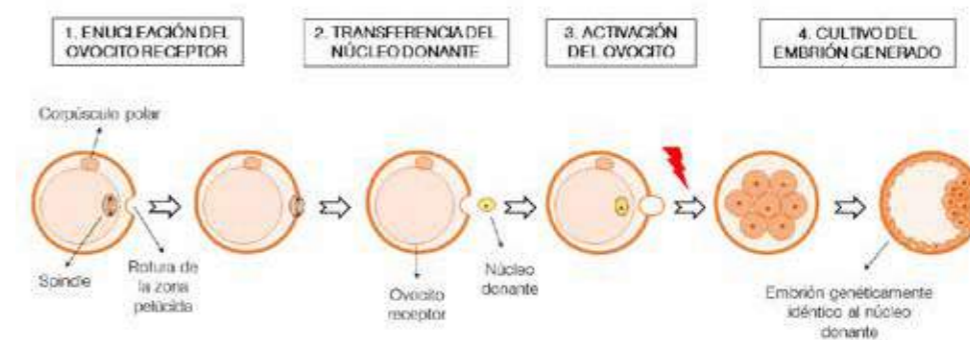


Figura 3. Pasos de la transferencia nuclear (NT).

## AULA JOVEN

*Potencial de la clonación: desde herramienta terapéutica y ganadera hasta tratamiento de la infertilidad*

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Blomberg LA, Telugu BPVL. Twenty years of embryonic stem cell research in farm animals. *Reprod Domest Anim* 2012;47 Suppl 4:80–85.

Bui HT, Wakayama S, Kishigami S, Kim JH, Van Thuan N, Wakayama T. The cytoplasm of mouse germinal vesicle stage oocytes can enhance somatic cell nuclear reprogramming. *Development* 2008;135:3935–3945.

Carlson DF, Lancto CA, Zang B, Kim ES, Walton M, Oldeschulte D, et al. Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines. *Nat Biotechnol* 2016;34:479–481.

Casser E, Israel S, Boiani M. Multiplying embryos: experimental monozygotic polyembryony in mammals and its uses. *Int J Dev Biol* 2019;63:143–155.

Chan AW, Dominko T, Luetjens CM, Neuber E, Martinovich C, Hewitson L, et al. Clonal propagation of primate offspring by embryo splitting. *Science* 2000;287(5451):317–319.

Cordova A, King WA, Mastromonaco GF. Choosing a culture medium for SCNT and iSCNT reconstructed embryos: from domestic to wildlife species. *J Anim Sci Technol* 2017;59.

Czernik M, Anzalone DA, Palazzese L, Oikawa M, Loi P. Somatic cell nuclear transfer: failures, successes and the challenges ahead. *Int J Dev Biol*, 2019;3-4-5; 123-130.

Escribá MJ, Valbuena D, Remohí J, Pellicer A, Simón C. New techniques on embryo manipulation. *J Reprod Immunol* 2002;55:149–161.

Gómez MC, Earle Pope C, Giraldo A, Lyons LA, Harris RF, King AL, et al. Birth of African Wildcat Cloned Kittens Born from Domestic Cats. *Cloning Stem Cells*, 2004;3; 247-258.

Gouveia C, Huyser C, Egli D, Pepper MS. Lessons Learned from Somatic Cell Nuclear Transfer. *Int J Mol Sci* 2020;21.

Greda P, Karasiewicz J, Modliński JA. Mouse zygotes as recipients in embryo cloning. *Reproduction* 2006;132:741–748. Häyry M. Ethics and cloning. *Br Med Bull* 2018;128:15–21.

Hildebrandt TB, Hermes R, Goeritz F, Appeltant R, Colleoni S, de Mori B, et al. The ART of bringing extinction to a freeze – History and future of species conservation, exemplified by rhinos. *Theriogenology*, 2021;; 76-88.

Holt WV, Pickard AR, Prather RS. Wildlife conservation and reproductive cloning. *Reproduction*, 2004;3; 317-324.

Jabbar A, Zulfiqar F, Mahnoor M, Mushtaq N, Zaman MH, din ASU, et al. Advances and Perspectives in the Application of CRISPR-Cas9 in Livestock. *Mol Biotechnol* 2021;63:757–767. Keefer CL. Artificial cloning of domestic animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:8874.

Lanza RP, Cibelli JB, Diaz F, Moraes CT, Farin PW, Farin CE, et al. Cloning of an Endangered Species (*Bos gaurus*) Using Interspecies Nuclear Transfer. *Cloning*, 2000;2; 79-90.

Lee BC, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, et al. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature* 2005;436:641.

Li GP, White KL, Bunch TD. Review of enucleation methods and procedures used in animal cloning: state of the art. *Cloning Stem Cells* 2004;6:5–13.

Loi P, Iuso D, Czernik M, Ogura A. A New, Dynamic Era for Somatic Cell Nuclear Transfer? *Trends Biotechnol*, 2016;10; 791-797.

Loi P, Modlinski JA, Ptak G. Interspecies somatic cell nuclear transfer: a salvage tool seeking first aid. *Theriogenology*, 2011;2; 217-228.

Loi P, Ptak G, Barboni B, Fulka J, Cappai P, Clinton M. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat Biotechnol*, 2001;10; 962-964.

Matoba S, Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, Mizutani E, Ogonuki N, et al. RNAi-mediated knockdown of Xist can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011;51; 20621-20626. Matoba S, Liu Y, Lu F, Iwabuchi KA, Shen L, Inoue A, et al. Embryonic development following somatic cell nuclear transfer impeded by persisting histone methylation. *Cell*, 2014;4; 884-895.

Matoba S, Zhang Y. Somatic Cell Nuclear Transfer Reprogramming: Mechanisms and Applications. *Cell Stem Cell* 2018;23:471.

Meir YJJ, Li G. Somatic Reprogramming—Above and Beyond Pluripotency. *Cells* 2021;10.

## AULA JOVEN

*Potencial de la clonación: desde herramienta terapéutica y ganadera hasta tratamiento de la infertilidad*

Moore SG, Hasler JF. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *J Dairy Sci* 2017;100:10314–10331. Mrowiec P, Bugno-Poniewierska M, Młodawska W. The perspective of the incompatible of nucleus and mitochondria in interspecies somatic cell nuclear transfer for endangered species. *Reprod Domest Anim*, 2021;2; 199-207.

Mullins LJ, Wilmut I, Mullins JJ. Nuclear transfer in rodents. *J Physiol* 2004;554:4.

Narbonne P, Miyamoto K, Gurdon JB. Reprogramming and development in nuclear transfer embryos and in interspecific systems. *Curr Opin Genet Dev* 2012;22:450–458.

Noli L, Ogilvie C, Khalaf Y, Ilic D. Potential of human twin embryos generated by embryo splitting in assisted reproduction and research. *Hum Reprod Update* 2017;23:156–165.

Omidi M, Khalili MA, Halvaei I, Montazeri F, Kalantar SM. Quality of Blastocysts Created by Embryo Splitting: A Time-Lapse Monitoring and Chromosomal Aneuploidy Study. *Cell J* 2020;22:367.

Polejaeva IA. 25th Anniversary of Cloning by Somatic Cell Nuclear Transfer: Generation of genetically engineered livestock using somatic cell nuclear transfer. *Reproduction* 2021;162:F11–F22.

Qu P, Shen C, Du Y, Qin H, Luo S, Fu S, et al. Melatonin Protects Rabbit Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) Embryos from Electrofusion Damage. *Sci Rep* 2020;10.

Rahbaran M, Razeghian E, Maashi MS, Jalil AT, Widjaja G, Thangavelu L, et al. Cloning and Embryo Splitting in Mammals: Brief History, Methods, and Achievements. *Stem Cells Int* 2021;2021.

Sansinena MJ, Hylan D, Hebert K, Denniston RS, Godke RA. Banteng (*Bos javanicus*) embryos and pregnancies produced by interspecies nuclear transfer. *Theriogenology*, 2005;4; 1081-1091.

Sartori C, Didomenico AI, Thomson AJ, Milne E, Lillico SG, Burdon TG, et al. Ovine-induced pluripotent stem cells can contribute to chimeric lambs. *Cell Reprogram* 2012;14:8–19.

Skrzyszowska M, Samiec M. Generation of Monogenetic Cattle by Different Techniques of Embryonic Cell and Somatic Cell Cloning - Their Application to Biotechnological, Agricultural, Nutritional, Biomedical and Transgenic Research - A Review. *Ann Anim Sci* 2021;21:741–755.

Spemann H. Entwicklungsphysiologische Studien am Triton-Ei. *Arch für Entwicklungsmechanik der Org* 1901;12:224–264.

Su Y, Zhu J, Salman S, Tang Y. Induced pluripotent stem cells from farm animals. *J Anim Sci* 2020;98:1–15.

Vanhove B, Duvaux O, Rousse J, Royer PJ, Evanno G, Ciron C, et al. High neutralizing potency of swine glyco-humanized polyclonal antibodies against SARS-CoV-2. *Eur J Immunol* 2021;51:1412–1422.

Watanabe S, Nagai T. Death losses due to stillbirth, neonatal death and diseases in cloned cattle derived from somatic cell nuclear transfer and their progeny: A result of nationwide survey in Japan. *Anim Sci J*, 2009;3; 233-238.

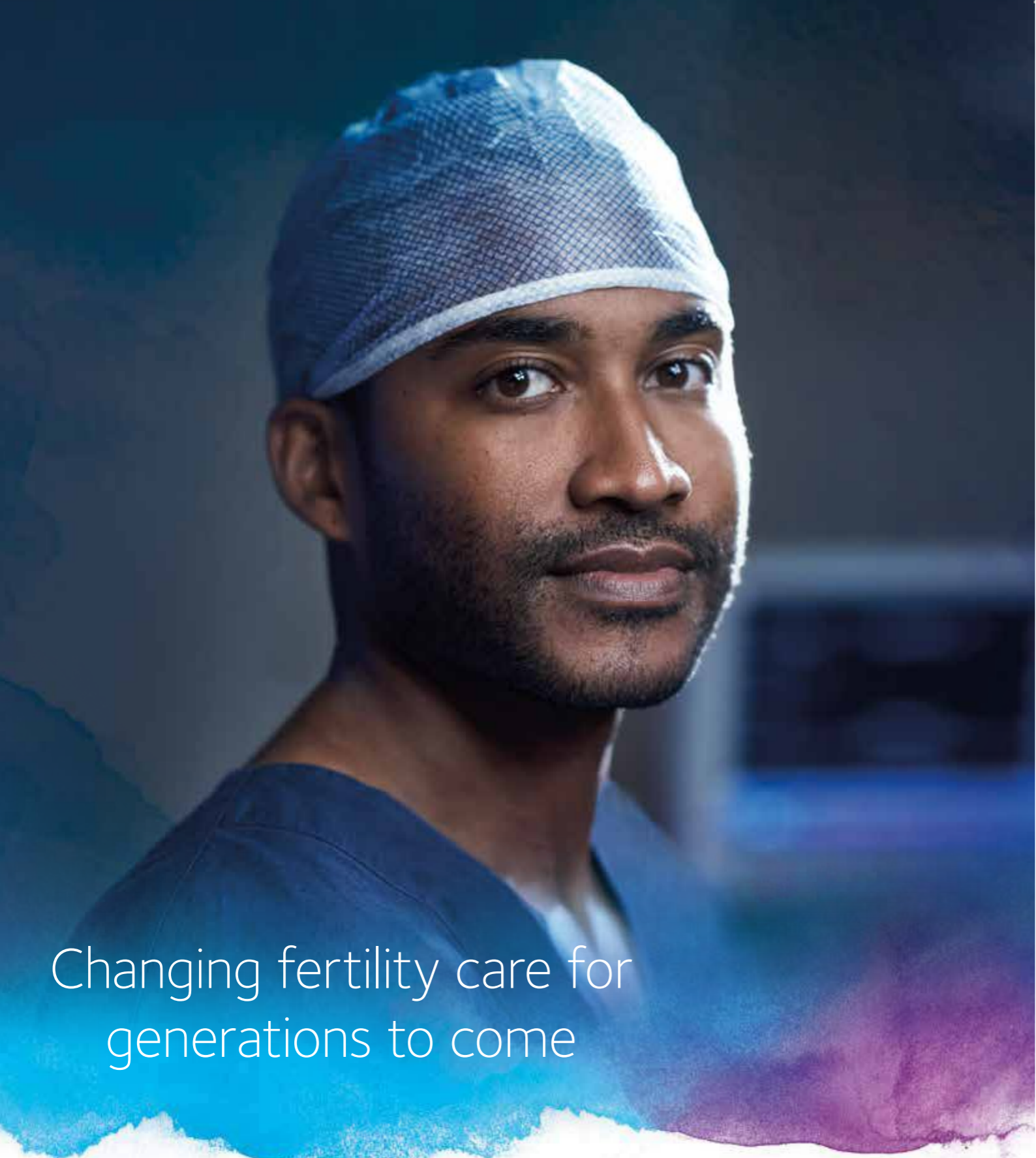
Willadsen SM, Lehn-Jensen H, Fehilly CB, Newcomb R. The production of monozygotic twins of preselected parentage by micromanipulation of non-surgically collected cow embryos. *Theriogenology* 1981;15:23–29.

Wilmut I, Bai Y, Taylor J. Somatic cell nuclear transfer: origins, the present position and future opportunities. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2015:1680; 20140366.

Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997;385:810–813.

Wisely SM, Ryder OA, Santymire RM, Engelhardt JF, Novak BJ. A Road Map for 21st Century Genetic Restoration: Gene Pool Enrichment of the Black-Footed Ferret. *J Hered*, 2015;5; 581-592.

Yang J, Shen MH. Polyethylene Glycol-Mediated Cell Fusion. *Methods Mol Biol* 2006;325



## Changing fertility care for generations to come

At CooperSurgical, we are on an ambitious journey to change fertility care. We strive to be the best partner for fertility clinics around the world by collaborating closely to utilize technologies and services that standardize and optimize clinical workflows. To work closely to utilize the potential of digital platforms, artificial intelligence and knowledge-sharing. And to break down the barriers that are standing in the way of parenthood. This way, we believe that together we can change fertility care. And not just today, but for #GenerationsToCome.

Read our perspective on changing fertility care for generations to come and much more on [forgenerationstocome.net](https://forgenerationstocome.net)



## AULA JOVEN

### DESCRIPCIÓN DE LOS RESULTADOS REPRODUCTIVOS EN EL PROGRAMA OVODONACIÓN/BANCO EN FUNCIÓN DE LA TÉCNICA UTILIZADA

#### DESCRIPTION OF THE REPRODUCTIVE OUTCOMES IN THE OVODONATION/BANK PROGRAM ACCORDING TO THE TECHNIQUE USED

*Paula Pascual<sup>1,2</sup>, Beatriz Amorcho<sup>2</sup>, Inmaculada Pérez<sup>2</sup>, Blanca Gadea<sup>2</sup>, Gema León<sup>2</sup>, María del Mar Martínez<sup>2</sup>, Elena Sellés<sup>2</sup>, Azahara Gracia<sup>2</sup>, Elena Martínez<sup>2</sup>, Beatriz Losa<sup>2</sup>, Manuel Muñoz<sup>2</sup>*

*1. paulapascual1@gmail.com*

*2. IVIRMA Alicante*

#### ► RESUMEN

El uso de gametos donados es una práctica recurrente en la clínica de reproducción asistida sobre aquellas parejas en las que tanto el gameto masculino como el femenino presentan dificultades para lograr el desarrollo de un embrión viable. Por ello, es de gran interés conocer la efectividad desde el punto de vista reproductivo del programa ovodonación/banco en función de cada técnica.

Se analizaron 368 transferencias embrionarias procedentes de 403 ciclos de reproducción asistida en los que se utiliza el Programa ovodonación/banco. Se determinaron 4 grupos de estudio en función de la técnica empleada en cada ciclo: FIV, ICSI con ovocitos frescos, ICSI con ovocitos vitrificados y el grupo mixto FIV/ICSI.

EL grupo de FIV presentó una menor tasa de fecundación respecto a los otros tratamientos ( $p < 0.001$ ). En cuanto al resto de variables reproductivas, los grupos FIV-ICSI y FIV parecen obtener mejores resultados, aunque sin evidencia estadística.

Este trabajo representa un primer abordaje de los resultados reproductivos en el Programa ovodonación/banco, siendo necesario ampliar el tamaño muestral para confirmar nuestros resultados.

**Palabras clave:** donación de gametos, FIV, ICSI, ovocitos frescos, ovocitos vitrificados.

#### ► ABSTRACT

The use of donated gametes is a common practice in the assisted reproduction treatments when both oocyte and sperm have complications to achieve the development of a viable embryo. Thus, it is important for us to know the efficiency of the eggs recipients/semen bank program depending on each technique in terms of reproductive outcomes.

368 embryo transfers from cycles of patients using the donation of both gametes were analyzed and the results depending on the technique used for each cycle were compared. 4 study groups were determined: IVF, ICSI with fresh oocytes, ICSI with vitrified oocytes and the IVF/ICSI group.

A lower fertilization rate was observed in the IVF group compared to the others ( $p < 0.001$ ). Regarding to the rest of variables, the IVF-ICSI and IVF groups seem to obtain better reproductive results, although there is no statistical evidence. This work represents a first approach to reproductive outcomes in the egg recipient/sperm bank program, requiring a larger sample size to confirm our results.

**Keywords:** gamete donation, IVF, ICSI, fresh oocytes, vitrified oocytes.

## AULA JOVEN

Descripción de los resultados reproductivos en el programa ovodonación/banco en función de la técnica utilizada

### INTRODUCCIÓN

La infertilidad es una enfermedad con un gran impacto social que afecta al 9% de la población mundial. Con ello, 72.4 millones de parejas presentan dificultades para lograr un embarazo, recurriendo muchas de ellas a técnicas de reproducción asistida (TRA) (Boivin et al., 2007). En aquellas parejas donde la infertilidad viene causada tanto por factor masculino como femenino, el programa ovodonación/banco representa una de las mejores estrategias para conseguir el desarrollo de un embrión viable.

El programa ovodonación/banco consiste en la donación de ambos gametos, femenino y masculino, en un mismo ciclo de reproducción asistida. Además de las parejas heterosexuales que precisan de la donación de ambos gametos por motivos de infertilidad, también pueden beneficiarse de este programa aquellas mujeres sin pareja o parejas de mujeres con un factor femenino severo que impida la producción de ovocitos adecuados para la generación de un embrión viable. Así, es de nuestro interés conocer cuál de las TRA presenta unos mejores resultados en el programa ovodonación/banco.

Tras realizar una búsqueda exhaustiva entre la literatura disponible, se observó que las publicaciones científicas relacionadas con el estudio que proponemos son escasas y ninguna de ellas estudia los resultados reproductivos de las TRA sobre ambos gametos de donante (Drakopoulos et al., 2019; Haas et al., 2021; Stimpfel et al., 2019; Ten et al., 2019).

Tan solo uno de los estudios revisados analiza los resultados reproductivos de FIV e ICSI en ciclos de ovocitos donados y semen normo de la pareja (Ten et al., 2019). En él observan una mayor tasa de fecundación en ICSI respecto a FIV (77.20% vs. 69.54%,  $p < 0.001$ ). En otro estudio (Stimpfel et al., 2019) en el que el gameto donado es el masculino, los ovocitos sometidos a ICSI también presentan una mayor tasa de fecundación (aunque esta diferencia no es significativa, 80% ICSI vs. 64% FIV,  $p = 0.767$ ), así como una mayor tasa de embarazo por transferencia (51.5 ± 8.8 ICSI vs. 11.1 ± 7.6 FIV,  $p = 0.004$ ). Aun así, el uso de ovocitos propios en estudios que comparan el rendimiento de ambas técnicas, FIV e ICSI (Drakopoulos et al., 2019; Haas et al., 2021), podría introducir un sesgo en los resultados.

Con la edad de la mujer, el ovario envejece afectando a la cantidad y calidad de los ovocitos reclutados en cada ciclo

(de Vet et al., 2002). Este descenso en la calidad ovocitaria podría afectar en gran medida al éxito del ICSI, técnica que requiere de una mayor manipulación; con lo que los ovocitos de calidad inferior podrían degenerar o desarrollar a embriones de bajo rendimiento. De esta forma, se podría atribuir erróneamente a la técnica FIV unos mejores resultados respecto al ICSI, siendo el principal responsable la calidad ovocitaria inicial, y no el desarrollo de una u otra técnica.

Consideramos que el presente estudio puede ayudar a solventar las dudas existentes en la comunidad científica sobre la conveniencia o no de realizar ICSI o FIV, así como utilizar ovocitos vitrificados o frescos en el caso de ICSI para el programa ovodonación/banco.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó una búsqueda exhaustiva entre la literatura disponible recopilando aquellos artículos que comparen distintas TRA utilizando uno o ambos gametos donados. Se seleccionaron publicaciones originales y de revisión a partir de la búsqueda de las palabras clave: "gamete donation", "sperm donor", "oocyte donor", "IVF", "ICSI", "oocyte vitrification". Estas palabras fueron combinadas para llevar a cabo la búsqueda bibliográfica. Como criterio de inclusión, únicamente fueron seleccionados aquellos artículos redactados en inglés.

Realizada la búsqueda bibliográfica y comprobada la relevancia de la elaboración del presente estudio, se reclutaron aquellos ciclos de Reproducción Asistida (RA) asociados al programa ovodonación/banco realizados entre el 1 de enero de 2005 y el 30 de junio de 2020 en la clínica IVIR-MA Alicante. Se diseñó un estudio retrospectivo, descriptivo, comparativo, observacional, transversal y unicéntrico, que fue presentado a la Unidad de Apoyo y Gestión de la Investigación (UAGI) y aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de IVI Valencia (CEI). Dicho estudio cumple con los principios éticos de la Declaración de Helsinki (World Medical Association, 2013).

Se seleccionó un total de 403 ciclos de reproducción asistida del programa ovodonación/banco, de los cuales 368 lograron la transferencia embrionaria. Estos fueron clasificados en función de la técnica realizada: FIV, ICSI o FIV/ICSI. A su vez, el grupo ICSI se subdividió en función del origen de los ovocitos, frescos o vitrificados (figura 1).

## AULA JOVEN

Descripción de los resultados reproductivos en el programa ovodonación/banco en función de la técnica utilizada

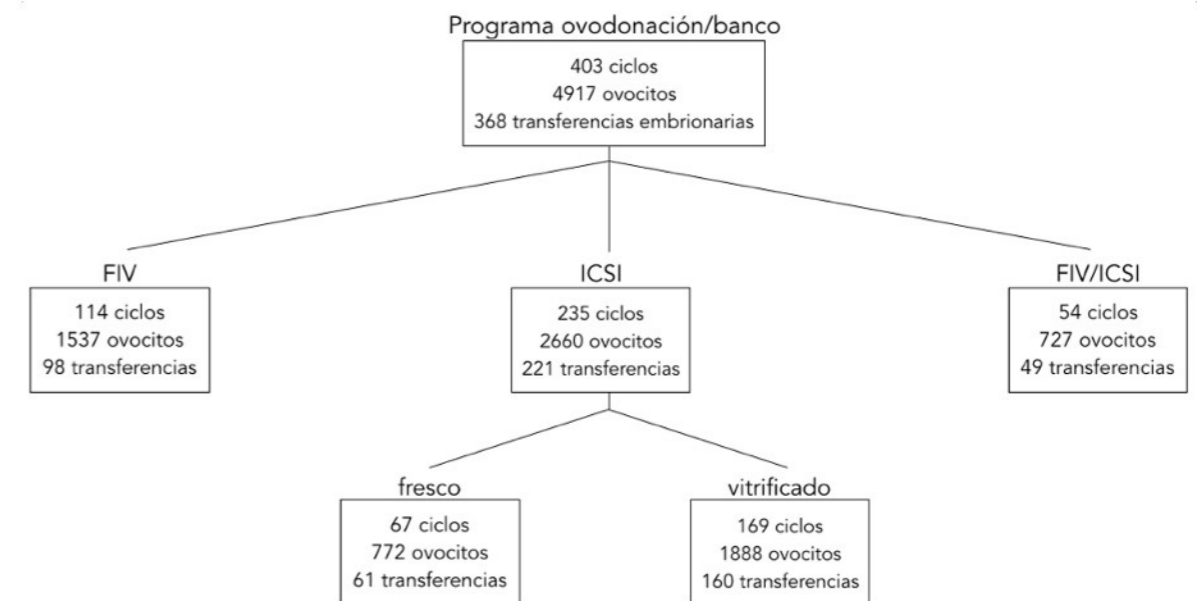


Figura 1. Diagrama de flujo mostrando la distribución de los grupos del estudio del programa ovodonación/banco.

Entre los pacientes que formaron parte del estudio se incluyeron: parejas heterosexuales que presenten dificultades para la recuperación de ovocitos de buena calidad y espermatozoides viables para la generación de un embrión sano, mujeres con problemas ovocitarios que desean llevar la maternidad en solitario, y parejas de mujeres homosexuales con mala calidad ovocitaria que recurren a las TRA.

Todos ellas necesitaban utilizar ovocitos y esperma de donante en su ciclo de reproducción asistida, bien por la imposibilidad de producirlos, por ser de mal pronóstico o por haber dado lugar a fallos repetidos de FIV/ICSI, por padecer enfermedades infecciosas transmisibles a la pareja o descendencia y también por necesitar la aportación del gameto masculino en parejas de mujeres. Las pacientes receptoras de ovocitos debían situarse entre los 30 y 50 años y no presentar malformaciones uterinas que comprometieran una gestación adecuada.

La calidad embrionaria fue evaluada de acuerdo con los parámetros de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR, 2015).

El software utilizado para el análisis estadístico fue el R-Studio. Para analizar diferencias en las variables demográficas entre los grupos de estudio se utilizó la Prueba ANOVA. Para el análisis de las variables cuantitativas entre los distintos tratamientos se utilizó el modelo lineal generalizado (glm) Poisson, mientras que para analizar diferencias entre las técnicas en cuanto a las variables categóricas se utilizó la Prueba Chi cuadrado de Pearson. En todas ellas se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ .

### RESULTADOS

Con el objetivo de describir la TRA más adecuada para el Programa ovodonación/banco, se evaluaron los tratamientos de 403 ciclos de reproducción asistida. En la tabla I se muestra el resumen descriptivo de cada tratamiento, incluyendo las variables de estudio, así como las variables demográficas.

Las variables demográficas (edad e índice de masa corporal) no mostraron evidencia estadística suficiente ( $p = 0.897$  y  $p = 0.777$ , respectivamente), demostrando que estas no influyen en los resultados del estudio.

## AULA JOVEN

Descripción de los resultados reproductivos en el programa ovodonación/banco en función de la técnica utilizada

|  | FIV          | ICSI         |              | FIV-ICSI     |
|--|--------------|--------------|--------------|--------------|
|  |              | Fresco       | Vitrificado  |              |
| N ciclos   | 114          | 67           | 169          | 54           |
| Edad receptora (media aritmética ± SD)                     | 41.19 ± 4.05 | 41.16 ± 4.26 | 41.53 ± 4.71 | 41.48 ± 3.73 |
| IMC receptora (kg/m <sup>2</sup> ) (media aritmética ± SD) | 23.90 ± 4.00 | 24.41 ± 5.74 | 24.98 ± 6.88 | 22.09 ± 1.61 |
| N ovocitos inseminados/microinyectados                     | 1527         | 772          | 1888         | 727          |
| N ovocitos maduros   | 1418         | 772          | 1888         | 716          |
| N ovocitos fecundados                                      | 1007         | 562          | 1433         | 526          |
| N transferencias embrionarias                              | 98           | 61           | 160          | 49           |
| N embriones transferidos                                   | 176          | 103          | 219          | 67           |
| Calidad ASEBIR   |              |              |              |              |
| embryones  |              |              |              |              |
| transferidos   |              |              |              |              |
| N grado A  | 53           | 29           | 63           | 14           |
| N grado B  | 99           | 51           | 122          | 47           |
| N grado C  | 24           | 23           | 34           | 6            |
| N sacos  | 81           | 44           | 101          | 37           |
| N gestación clínica  | 61           | 34           | 85           | 29           |
| N aborto clínico   | 11           | 7            | 11           | 3            |
| N RNV  | 63           | 35           | 84           | 33           |

Tabla 1. Resumen descriptivo de los tratamientos del Programa ovodonación/banco.

Como observamos en la tabla 1, al tratarse de pacientes receptoras de ovocitos, en los casos de ICSI, tanto para ovocitos en fresco como vitrificados, a la receptora se le donaron únicamente ovocitos maduros (MII) una vez decumulados. Sin embargo, en los casos de FIV se donó el número total de ovocitos recuperados en punción, desconociendo su estado de maduración (MII, MI o vesícula germinal).

En la figura 2 se presentan los resultados reproductivos del Programa ovodonación/banco para cada uno de los tratamientos.

Tal como estudian Ten et al. (2019) y Sunderam et al. (2020), calculamos dos variantes de la tasa de fecundación: en la

primera (figura 2.A.) realizamos el cálculo a partir del número total de ovocitos inseminados o microinyectados; mientras que en la segunda (tasa de fecundación ponderada) tuvimos en cuenta solo los ovocitos maduros, excluyendo de los sometidos a FIV, aquellos que resultaron inmaduros tras la decumulación (figura 2.B.).

Únicamente se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para la tasa de fecundación entre el grupo de FIV y los demás tratamientos (figura 2.A.) ( $p < 0.001$ ), utilizando para el cálculo el total de ovocitos inseminados o microinyectados. Sin embargo, al calcular la tasa de fecundación ponderada, los resultados en los grupos FIV y FIV/ICSI mejoran notablemente, acortando las diferencias entre todos los

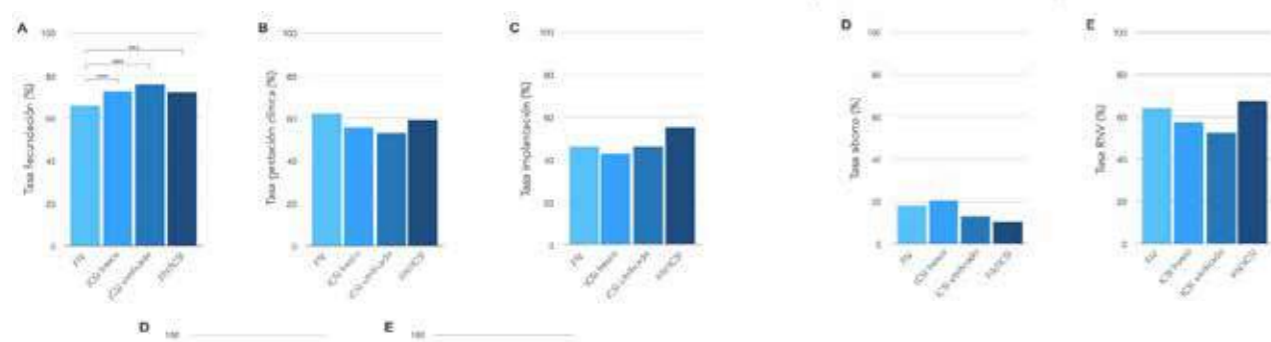


Figura 2. Resultados reproductivos del Programa ovodonación/banco en función de la técnica utilizada. (A) Tasa de fecundación, \*\*\*  $p$ -valor  $< 0.001$ . (B) Tasa de fecundación ponderada teniendo en cuenta únicamente los ovocitos maduros inseminados/microinyectados. (C) Tasa de gestación clínica. (D) Tasa de implantación. (E) Tasa de aborto. (F) Tasa de RNV (recién nacido vivo).

## AULA JOVEN

Descripción de los resultados reproductivos en el programa ovodonación/banco en función de la técnica utilizada

grupos y no obteniendo significancia estadística ( $p > 0.05$ ) (figura 2.B.). Aunque se encuentran diferencias en las tasas de gestación clínica, implantación, aborto clínico y RNV entre los grupos, estas tampoco presentan significancia estadística al comparar cada uno de los tratamientos ( $p > 0.05$ ) (figuras 2.C., 2.D., 2.E. y 2.F.).

Por otro lado, analizamos los resultados del grupo FIV-ICSI. Las 49 transferencias de este tratamiento se clasificaron en subgrupos de acuerdo con la técnica de fecundación realizada. De este modo, 24 transferencias embrionarias pertenecen al subgrupo FIV, 17 al subgrupo ICSI y las 8 transferencias restantes en las que se transfirieron dos embriones (a petición de las pacientes), cada uno procedente de una técnica de fecundación, formaron el subgrupo FIV-ICSI. Aunque el tamaño muestral de este último grupo no permite realizar el análisis estadístico, en la tabla II se muestra el resumen de los resultados reproductivos.

Además se analizó la calidad según la clasificación de ASEBIR de los embriones transferidos en cada grupo. De este modo, se compararon los grados ASEBIR en función del tratamiento realizado (figura 3).

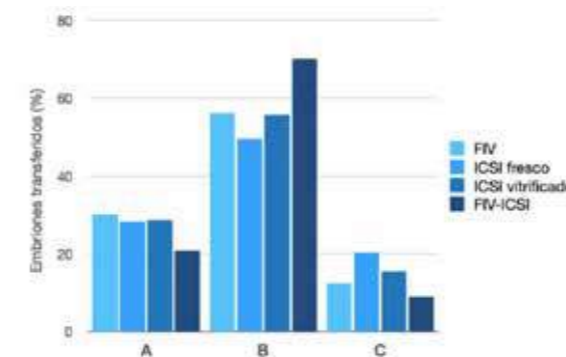


Figura 3. Grados de calidad según la clasificación ASEBIR de los embriones transferidos en función de la técnica empleada.

Tras realizar el análisis estadístico, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cada grado en función de la TRA realizada ( $p > 0.05$ ).

Posteriormente, se agruparon las calidades ASEBIR de los embriones transferidos en aquellos con mayor potencial de implantación (grados A y B) y aquellos con menor potencial (grado C). Se estudiaron los distintos tratamientos en función de los grados con mayor y menor potencial de implantación, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas (figura 4).

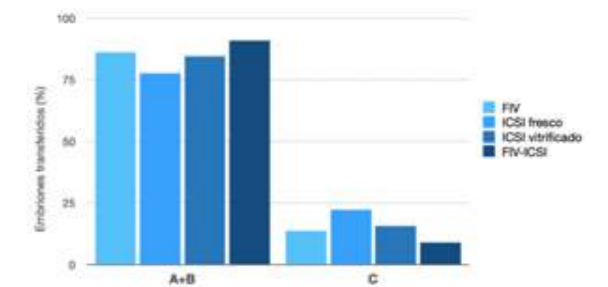


Figura 3. Grados de calidad ASEBIR agrupados de acuerdo con el potencial de implantación de los embriones transferidos en función de la técnica empleada.

## DISCUSIÓN

Con este estudio se pretende dar un paso hacia delante en la comprensión del Programa ovodonación/banco y poder, en un futuro, diseñar un estudio prospectivo con tal de optimizar el rendimiento de los ciclos de RA. Además, la literatura referente a este tema es escasa, no encontrando estudios que comparen las distintas TRA en ciclos en los que se utilice la donación de ambos gametos. A continuación, se discuten algunas variables de interés que permiten interpretar el éxito de una TRA respecto a otra.

Analizados los resultados reproductivos de cada tratamiento, únicamente la tasa de fecundación calculada a partir de los ovocitos inseminados/microinyectados muestra diferencias estadísticamente significativas (figura 2). El tratamiento de ICSI con ovocitos vitrificados es el que muestra una mayor tasa de fecundación (75.90%), presentando diferencias estadísticamente significativas respecto al tratamiento FIV (65.94%,  $p < 0.001$ ), pero no frente al resto de grupos (72.79% ICSI fresco, 72.35% FIV-ICSI). De este modo, observamos que el grupo FIV tiene la menor tasa de fecundación, con significancia estadística frente al resto de grupos ( $p < 0.001$ ) (figura 2.A.). Los tratamientos en los que se utiliza la técnica ICSI muestran una mayor tasa de fecundación respecto a los que se emplea la técnica FIV. Aun así, los grupos en los que se emplea la técnica de ICSI no presentan significancia estadística frente al grupo FIV-ICSI, en el que se emplean las dos técnicas de fecundación. Aunque para el cálculo de esta tasa de fecundación estemos teniendo en cuenta también los ovocitos inmaduros de FIV, lo que puede mermar la tasa de fecundación respecto a los MII microin-

## AULA JOVEN

### Descripción de los resultados reproductivos en el programa ovodonación/banco en función de la técnica utilizada

yectados; el desconocimiento del grado de maduración de los ovocitos sometidos a la técnica de FIV es inherente al desarrollo de esta técnica.

Así, también calculamos la tasa de fecundación ponderada, descartando los ovocitos inmaduros del cálculo, de modo que los resultados de ambas técnicas, FIV e ICSI, sean equiparables y el posible sesgo sea menor (figura 2.B.). El cálculo de la tasa de fecundación a partir de solo los ovocitos maduros hace aumentar los resultados de estos grupos (71.01% en FIV y 73.46 % en FIV/ICSI), siendo ahora similares a los grupos ICSI fresco (72.79%) y vitrificado (75.90%) y, por tanto, sin significancia estadística.

Consultando la literatura disponible, existe controversia en cuanto a la elección de una técnica u otra para lograr la fecundación. El grupo de Sunderam (2020) defiende no encontrar diferencias estadísticamente significativas cuando la esterilidad no viene dada por un factor masculino. Por el contrario, y acorde a nuestros resultados, el estudio de Johnson et al. (2013) muestra una tendencia favorable al uso de la microinyección para aumentar el éxito de la fecundación en parejas de esterilidad de origen desconocido. Del mismo modo, Ten et al. (2019) obtienen una tasa de fecundación superior para el tratamiento de ICSI respecto a la de FIV sobre ovocitos donados y semen normozoospermico, siendo sus diferencias estadísticamente significativas (77.20% en ICSI, 69.54% en FIV,  $p < 0.001$ ). Sin embargo, con el cálculo de la tasa de fecundación ponderada observan mejores resultados en el grupo de FIV (69.3%) respecto del grupo de ICSI (66.0%), aunque sin significancia estadística. El aparente éxito del grupo de FIV frente al de ICSI lo atribuyen a la maduración de algunos ovocitos MI durante el tiempo de inseminación pudiendo lograr la fecundación, mientras que si esos ovocitos inmaduros hubiesen sido destinados a ICSI habrían sido descartados. Aun con esto, en nuestro estudio, el grupo de FIV es el que presenta una menor tasa de fecundación ponderada, aunque tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas (figura 2.B.).

Además de la importancia en la elección de la técnica de fecundación in vitro, el estado inicial de los ovocitos también parece afectar al éxito de la tasa de fecundación. Aunque no se encuentran diferencias significativas entre los grupos, como se comentó anteriormente, el grupo de ICSI con ovocitos vitrificados ofrece unos mejores resultados sobre los demás tratamientos (figura 2.A.). El estudio de Domingues et al. (2017) coincide con nuestros resultados, obteniendo una mayor tasa de fecundación en el grupo de ICSI vitrificado

(77.4%) vs. el grupo de ICSI fresco (74.5%) ( $p = 0.195$ ) sobre ovocitos donados, aunque sin significancia estadística.

El hecho de no encontrar diferencias significativas entre los grupos respecto al resto de variables puede deberse a un tamaño muestral insuficiente (figura 1). A pesar de esto, sí podemos discutir los resultados reproductivos obtenidos a partir de cada tratamiento.

Como se puede apreciar en la figura 2.D, el grupo mixto de FIV-ICSI ofrece mejores resultados en cuanto a la tasa de implantación (55.22%) respecto a los otros grupos (46.02% FIV, 42.72% ICSI fresco, 46.12% ICSI vitrificado), aunque sin significancia estadística. Se debe tener en cuenta que en este grupo de pacientes se realizaron 8 transferencias de dos embriones a petición de las pacientes, siendo recomendable la transferencia de un único embrión.

El tratamiento a partir del cual se obtienen mejores resultados en cuanto a la gestación clínica es el grupo de FIV, con un 62.24 % de gestaciones (figura 2.C). Los demás tratamientos consiguen tasas similares (59.18% FIV-ICSI, 55.74% ICSI fresco y 53.12% ICSI vitrificado), sin ser estadísticamente significativa la diferencia entre ninguno de los grupos. Nuestros resultados parecen indicar que un tratamiento menos invasivo como el tratamiento de FIV o el mixto de FIV-ICSI favorece una mayor tasa de gestación.

Los grupos en los que la tasa de aborto es más elevada son los tratamientos de ICSI con ovocitos en fresco (20.59%) y FIV (18.03%), mientras que los grupos ICSI vitrificado (12.94%) y FIV-ICSI (10.34%) presentan una tasa más baja, de nuevo sin significancia estadística (figura 2.E.).

Una vez más, los tratamientos que ofrecen unas mejores tasas, en este caso respecto a RNV, son los grupos FIV-ICSI (67.35%) y FIV (64.29%), en comparación con los obtenidos por los otros grupos (57.38% en ICSI fresco y 52.50% en ICSI vitrificado), no resultando sus diferencias estadísticamente significativas (figura 2.F.).

De acuerdo con los resultados y ante la falta de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para la mayoría de las variables reproductivas, se necesitará ampliar el tamaño muestral del estudio con el objeto de conseguir una mayor evidencia científica y afianzar nuestros resultados. Por otro lado, en el grupo FIV-ICSI, como se ha comentado anteriormente, se realizan ambas técnicas de fecundación sobre la cohorte ovocitaria donada a una misma paciente

## AULA JOVEN

### Descripción de los resultados reproductivos en el programa ovodonación/banco en función de la técnica utilizada

en un ciclo de reproducción asistida. De esta forma, aproximadamente la mitad de los ovocitos donados a la paciente son inseminados, mientras que la otra mitad son microinyectados. Este grupo es de gran interés para el estudio de los resultados reproductivos en función de la técnica de fecundación, pues los resultados obtenidos están sujetos a un menor sesgo al hacer uso de gametos de los mismos donantes en el mismo ciclo.

Así, estudiamos el grupo FIV-ICSI en función de la técnica de fecundación realizada sobre el embrión o embriones transferidos. En este estudio, el grupo FIV-ICSI queda subdividido en 3 subgrupos: aquellos embriones transferidos procedentes de ovocitos fecundados con la técnica FIV (subgrupo FIV), los fecundados con la técnica ICSI (subgrupo ICSI) y los que, al transferir dos embriones de forma conjunta, cada uno proviene de una técnica de fecundación distinta (subgrupo FIV-ICSI) (tabla II). Observamos una mayor transferencia de embriones procedentes de ovocitos fecundados con la técnica FIV (24 transferencias embrionarias), seguida por la técnica ICSI (17 transferencias embrionarias) y, por último; con un número menor, el subgrupo FIV-ICSI (8 transferencias).

Aunque el tamaño muestral del grupo FIV-ICSI es pequeño y no permite su análisis estadístico; sí podemos observar que el número de transferencias en el subgrupo FIV-ICSI es mucho menor, transfiriéndose dos embriones de forma conjunta a petición de las pacientes. La técnica ICSI parece ofrecer una mejor calidad ASEBIR, obteniendo un 36.36% de embriones grado A transferidos (tabla II). Sin embargo, el subgrupo FIV-ICSI ofrece los mejores resultados reproductivos (75% tasa de gestación, 62.5% tasa de implantación y 0% tasa de aborto) (tabla II), siendo los resultados de los subgrupos FIV e ICSI similares entre ellos. El aparente éxito del subgrupo de embriones transferidos a partir de las dos técnicas (FIV-ICSI) respecto a los grupos de embriones transferidos a partir de una sola de ellas (FIV o ICSI) puede ser debido a la transferencia de dos embriones por ciclo (a petición de la paciente), mientras que los subgrupos FIV e ICSI incluyen también las transferencias de un único embrión. Entre las técnicas de fecundación, FIV o ICSI, del subgrupo de FIV se obtiene unas mayores tasas de gestación clínica e implantación (tasa de gestación clínica del 58.33% en FIV vs. 52.94% en ICSI, tasa de implantación del 55.17% en FIV vs. 50% en ICSI). Sin embargo, la mayor tasa de aborto en el subgrupo de FIV (21.43% en FIV vs. 0% en ICSI) hace aumentar la tasa de RNV en el subgrupo de ICSI (58.82%) respecto del subgrupo de FIV (54.17%) (tabla II).

Aunque el análisis de los procedimientos FIV-ICSI es interesante, el tamaño muestral debería ser ampliado con el objeto de obtener resultados con una mayor evidencia científica. Además, el subgrupo FIV-ICSI, en el que se transfieren dos embriones, aun presentando un sesgo mucho menor, es una práctica no recomendada en las TRA.

Adicionalmente se estudió la clasificación ASEBIR en cada tratamiento. Esta permite ordenar los embriones de una cohorte embrionaria en función de su morfología en D+3 y D+5/D+6 con el objeto de transferir aquel embrión con mayor potencial de implantación. Así, los embriones se clasificaron en A, B, C y D de acuerdo con esta clasificación, siendo los A los de mejor pronóstico. El grado B fue el más transferido de entre los ciclos participantes en el presente estudio, seguido por el A (figura 3). Este grado corresponde a embriones de buena calidad con elevada capacidad de implantación. El grupo que cuenta con un mayor porcentaje de embriones transferidos de grado A es el de FIV, pese a que los otros tratamientos presentan porcentajes similares, sin significancia estadística.

Al agrupar los grados de acuerdo con su potencial de implantación (grados A+B y C, respectivamente) (figura 4) tal como estudian Ten et al. (2019), observamos que los tratamientos a partir de los que se ha transferido un mayor porcentaje de embriones con un alto potencial de implantación (A+B) son los grupos de FIV-ICSI (91.04%) y FIV (86.36%), aunque de nuevo sin diferencias estadísticamente significativas. Como se ha descrito anteriormente, en nuestro estudio los grupos de FIV y FIV-ICSI han obtenido mayores tasas de gestación clínica, implantación y RNV respecto de los otros grupos (ICSI fresco-vitrificado) (figuras 2.C., 2.D., 2.F.), pudiendo relacionarse con la mayor proporción de embriones transferidos con un mayor potencial de implantación.

A pesar de haberse encontrado diferencias significativas en la tasa de fecundación en el grupo de FIV siendo menor que la de los otros grupos, estas diferencias pierden significancia estadística al realizar el cálculo excluyendo los ovocitos inmaduros sometidos a FIV. Asimismo, observamos una tendencia en la mejora de resultados en este grupo tanto en gestación como en RNV. Se necesitan más estudios para confirmar estos resultados.

Nuestros resultados podrían concordar con los obtenidos por Ten et al. (2019). Mientras transfieren un número similar de embriones grado A+B en los grupos de FIV e ICSI ( $1.53 \pm 0.6$  en FIV vs.  $1.51 \pm 0.6$  en ICSI,  $p = 0.553$ ), sí transfieren un

## AULA JOVEN

Descripción de los resultados reproductivos en el programa ovodonación/banco en función de la técnica utilizada

número mayor de embriones C+D en el grupo ICSI respecto al grupo de FIV ( $0.11 \pm 0.5$  en FIV vs.  $0.21 \pm 0.5$  en ICSI,  $p < 0.001$ ), logrando significancia estadística en este último caso. Sus resultados podrían relacionarse con el éxito del grupo de FIV respecto del de ICSI, a partir del cual logran una mayor tasa de implantación ( $50.4\%$  FIV vs.  $43\%$  ICSI,  $p = 0.031$ ) (Ten et al., 2019) y, asimismo, con nuestros resultados, los cuales apuntan hacia un éxito de los tratamientos en los que se emplea la técnica FIV frente a aquellos en los que solo se utiliza la técnica ICSI.

El Programa ovodonación/banco es una de las mejores estrategias para que aquellos pacientes que, mediante el uso de sus propios gametos, no consiguen el desarrollo de un embrión viable y posterior RNV en casa, puedan lograrlo con la donación de gametos. Este trabajo representa una primera aproximación para determinar las técnicas que obtienen mejores resultados reproductivos en el Programa ovodonación/banco. Para confirmar nuestros resultados será necesario ampliar el tamaño muestral de cada grupo con objeto de aumentar la evidencia científica del estudio.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASEBIR. Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos. En: Cuadernos de Embriología Clínica. 3ª ed. Madrid, España; 2015.

Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. Hum Reprod 2007;6: 1506-1512.

De Vet A, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC. Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. Fertil Steril 2002;2: 357-362.

Domingues TS, Aquino AP, Barros B, Mazetto R, Nicolielo M, Kimati CM, et al. Egg donation of vitrified oocytes bank produces similar pregnancy rates by blastocyst transfer when compared to fresh cycle. J Assist Reprod Genet 2017;11: 1553-1557.

Drakopoulos P, Garcia-Velasco J, Bosch E, Blockeel C, de Vos M, Santos-Ribeiro S, et al. ICSI does not offer any benefit over conventional IVF across different ovarian response categories in non-male factor infertility: a European multicenter analysis. J Assist Reprod Genet 2019;10: 2067- 2076.

Haas J, Miller TE, Nahum R, Aizer A, Kirshenbaum M, Zilberberg E, et al. The role of ICSI vs. conventional IVF for patients with advanced maternal age-a randomized controlled trial. J Assist Reprod Genet 2021;1: 95-100.

Johnson LN, Sasson IE, Sammel MD, Dokras A. Does intracytoplasmic sperm injection improve the fertilization rate and decrease the total fertilization failure rate in couples with well-defined unexplained infertility? A systematic review and meta-analysis. Fertil Steril 2013;3: 704-711.

Stimpfel M, Jancar N, Vrtacnik-Bokal E, Virant-Klun I. Conventional IVF improves blastocyst rate and quality compared to ICSI when used in patients with mild or moderate teratozoospermia. Syst Biol Reprod Med 2019;6: 458-464.

Sunderam S, Boulet SL, Kawwass JF, Kissin DM. Comparing fertilization rates from intracytoplasmic sperm injection to conventional in vitro fertilization among women of advanced age with non-male factor infertility: a meta-analysis. Fertil Steril 2020;2: 354-363.e1.

Ten J, Peinado P, Guerrero J, Bernabeu A, Llacer J, Orozco-Beltran D, et al. Comparison of the assisted reproductive technology outcomes between conventional IVF and ICSI with donor oocytes in normozoospermic patients. Hum Fertil (Camb) 2019; 1-7.

World Medical Association. Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. JAMA 2013; 310(20):2191-2194.



# ASEBIR

Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción

## NOTICIAS

### ASAMBLEA DE SOCIOS ASEBIR



El sábado **12 de noviembre**, coincidiendo con la 8ª Convocatoria del Examen de Certificación ASEBIR, se celebró la **XXXV Asamblea General Ordinaria** de socios ASEBIR en el Hotel Rafael Hoteles Atocha de Madrid, con el siguiente Orden del Día:

- Aprobación del acta anterior
- Introducción a cargo de Presidencia
- Informe Tesorería y aprobación de cuentas
- Informe Vocalías
- Ruegos y preguntas

Recordad que desde <https://asebir.com/zona-de-socios/asamblea/> podéis descargaros el Cuaderno de Ruta, Preparando la Asamblea 2022 y consultar el Acta de la reunión.

Tras la Asamblea se ofreció un almuerzo tipo Coctel a todos los asistentes al examen y a la Asamblea que quisieron/pudieron acompañarnos.

Al término del almuerzo hubo reunión de la Junta Directiva con los presidentes/representantes de los diferentes Grupos de Interés de ASEBIR que resultó muy fructífera.

**Gracias a todos por acompañarnos interrumpiendo vuestro descanso.**

# NOTICIAS

## XII CONGRESO ASEBIR EN PALMA DE MALLORCA



¡Ya queda menos!

Los días **15, 16 y 17 de noviembre de 2023** celebraremos el **XII Congreso ASEBIR en Palma de Mallorca**. Y a primeros de enero estará a disposición de todos vosotros la web del Congreso.

En ella encontraréis información sobre el envío de Comunicaciones y sobre los Premios que se entregarán durante el Congreso, entre otras cosas.

Y esperamos que el programa científico despierte vuestro interés, ya que contaremos con prestigiosos ponentes, como Samuel Ojosnegros (IBEC), Fernando Abellán (Derecho Sanitario Asesores), Shai Carmi (Hebrew University of Jerusalem), María José Escribá (IVI Valencia) o Ellen Goossens (VUB) entre otros. Y se tratarán interesantes temas como el "Uso de úteros artificiales" o debates como el que mantendrán Jason E. Swainy (CCRM) y Gloria Calderón (Embryotools), sobre la "Optimización de sistemas de cultivo".

El Comité Científico y Organizador está trabajando duramente para conseguir que esta nueva edición del Congreso ASEBIR sea todo un éxito. Con vuestra asistencia lo será.

¡Hasta pronto!



## 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.
- Ofrezcáale 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](mailto:info@lab-courier.com)

### IMAGEN DE PORTADA

Alejandro Montoya Ureta, director del área clínica y científica de OVA IVF en Zurich (Suiza)

### IMAGEN DE CONTRAPORTADA

Extracto de Logotipo oficial ASEBIR



# 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](http://www.asebir.com) / [asebir@asebir.com](mailto:asebir@asebir.com)

---

