



Fundación
J. L. Castaño

Para el desarrollo del Laboratorio clínico

REPRODUCCIÓN HUMANA Y LABORATORIO CLÍNICO

Ed Cont Lab Clín; 32: 112 - 120

SEQC^{ML}

Sociedad Española de Medicina de Laboratorio

2016-2017

FUTURO DEL LABORATORIO DE REPRODUCCION HUMANA ASISTIDA.

Jose Antonio Castilla.

U. Reproducción, UGC de Laboratorio Clínico y UGC de Obstetricia y Ginecología, HU Virgen de las Nieves, Instituto de Investigación Biosanitario de Granada, Granada.

Banco de semen y ovocitos, CEIFER Biobanco, Granada, España

Departamento Anatomía y Embriología Humana, Facultad Medicina, U. Granada.

Mari Carmen Gonzalvo.

U. Reproducción, UGC de Laboratorio Clínico y UGC de Obstetricia y Ginecología, HU Virgen de las Nieves, Instituto de Investigación Biosanitario de Granada, Granada.

1. INTRODUCCIÓN

El laboratorio de reproducción humana asistida (LRHA) evolucionará en los años próximos paralelo hacia donde otros laboratorios clínicos están evolucionado ya. Estos cambios implicarán a los Sistemas de calidad, automatización, estandarización, seguridad y globalización. Dejamos fuera del contenido de este tema, por encontrarse en un futuro lejano de aplicación clínica, técnicas como la obtención de gametos a partir de células madre o la aplicación de la nanotecnología para tratar defectos espermáticos.

2. SISTEMAS DE CALIDAD

El futuro en gestión de calidad en el laboratorio estará marcado por la reciente norma de calidad específica de los laboratorios de reproducción asistida (UNE 179007: Servicios Sanitarios. Sistema de gestión de la calidad para laboratorios de reproducción asistida). Esta norma amplía la Norma ISO 9001, recoge las inquietudes manifestadas por los profesionales dedicados al LRHA y tiene el aval de Sociedades Científicas, Unidades de RHA, administración, y universidades.

En la norma UNE 179007 se establece que el laboratorio de reproducción debe definir e implantar indicadores de calidad, para los procesos operativos. En esta línea los laboratorios deberán monitorizar dichos indicadores debiendo utilizar herramientas estadísticas adecuadas como la media móvil o diagramas de globos. Los indicadores a medir establecidos en la

UNE 179007 deberán valorarse mediante la comparación con los estándares o especificaciones de calidad establecidas por sociedades científicas, como ASEBIR. Esta sociedad establece tres niveles de calidad (Óptima, deseable y mínima) y su estimación se ha basado en el método del estado del arte o el de consenso de expertos, utilizando los datos recopilados por el registro de la Sociedad Española de la Fertilidad (SEF). Dado que los avances tecnológicos aumentaran el rendimiento de las técnicas de reproducción asistida estos estándares deberán corregirse en base al estado del arte futuro.

Otro aspecto destacado de dicha normativa es la trazabilidad, ya que para las directivas europeas que se encuentran en la raíz de dicha norma, es fundamental garantizarla. En abril de 2015 se publicó en el diario oficial de la Comisión Europea la Directiva (UE) 2015/565 de 8 de abril de 2015 por la que se modifica la Directiva 2006/86/CE en lo relativo a determinados requisitos técnicos para la codificación de células y tejidos humanos. Dicha directiva por tanto afecta directamente a gametos y embriones. La directiva establece que debe asignarse un código único europeo (SEC) que permita la identificación de los gametos y embriones donados fuera de la pareja que se distribuyan para su uso en humanos. Dicho código se compondrá de 40 caracteres, 21 corresponderán a la secuencia de identificación de la donación (DEC) y 19 a la secuencia de identificación del producto (PEC).

La directiva excluye a los gametos y embriones que se utilicen dentro de la pareja, pero afecta a los gametos y embriones de donante que se almacenen para su posterior distribución. En caso de donación en fresco (ovocitos) deja a la decisión de las autoridades competentes nacionales su aplicación o no. La directiva establece la entrada en funcionamiento del SEC a los 18 meses de su publicación (octubre 2016),. A partir de esa fecha todos los gametos y células almacenadas que no tengan SEC deberán usarse en un plazo de 5 años desde esa fecha. Y a partir de esa fecha (octubre 2016) toda célula que se almacene deberá poseer su SEC. En caso de que dicho código no pueda adherirse al soporte primario (ej., pajuela o dispositivo de vitrificación) deberá de adjuntarse el SEC en una hoja separada, que se empaquetará con el soporte primario de manera que se garantice que permanezcan juntos, y el SEC esté vinculado de forma inequívoca a las células.

Dado que dentro del DEC se incluye un código referido al centro donde se realiza la donación, la directiva establece que las autoridades competentes de los Estados miembros deben actualizar el registro de establecimientos de tejidos, reflejando cualquier cambio en las acreditaciones, designaciones, autorizaciones o aprobaciones de los establecimientos de Tejidos. Esto significa que nuestra autoridad sanitaria debe actualizar el registro de centros pues actualmente los centros españoles se encuentran incluidos en EURO CET pero no en EURCET128. EURO CET es una plataforma virtual de información que contiene registros de las autoridades competentes y de los establecimientos de reproducción asistida en la Unión Europea. Los estados colaboran voluntariamente suministrando datos anualmente de la actividad realizada en ellos. Esta plataforma está organizada por el Centro de trasplantes italiano. Sin embargo, EURO CET128 es un contrato de servicios, el cual utiliza lo realizado por EURO CET para crear una plataforma de codificación de la UE que estará organizada

por la Comisión Europea para implantar el SEC. Dicha plataforma contendrá, entre otros, el Compendio de centros de reproducción asistida.

Actualmente la mayoría de centros españoles poseemos un código de EURO CET, pero no estamos incluidos en el compendio de centros de UROCET128. Para estar incluidos la autoridad sanitaria tiene que demostrar ante EURO CET128 que dichos centros siguen las directivas europeas de bancos de tejidos y células. Por esto se están empezando a realizar en muchas comunidades autónomas inspecciones siguiendo dichas directivas, con el objeto de poder incluir a dichos centros en el compendio de centros de EURO CET128. Diversas Sociedades científicas manifestaron en su día a través del documento "Recomendaciones para la aplicación del RD 1301/2006" (ahora Real Decreto-Ley 9/2014), los múltiples conflictos interpretativos de este Real Decreto. Estas sociedades solicitaron a la autoridad sanitaria competente que dicho documento sirviera de referencia para la interpretación de dicha norma.

Otro componente de DEC es el número único de donación. La manera para asignarlo deberá ser establecida por la autoridad sanitaria, pudiendo ser centralizado a nivel nacional, internacional o por centros. El desarrollo de sistemas informáticos para obtener dicho número se establece en la directiva. Es evidente, que este número único de donación debería implantarse junto al Registro de donantes de gametos, pues la coordinación entre ambos, si se planifica desde el inicio será bastante más fácil que si se desarrollan por separado. Por esto creemos fundamental desarrollar ambos objetivos de forma paralela. El Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad está en fase de desarrollo de una plataforma encaminada a cumplir los objetivos comentados y denominada Sistema de Información en Reproducción Humana Asistida (SIRHA). Teniendo programado el inicio del pilotaje de dicha plataforma para antes de verano de 2016.

Una vez implantado el SEC, en el futuro se deberán desarrollar dispositivos para incorporarlo a los dispositivos de almacenamiento y cultivo de muestras biológicas reproductivas. Diversas líneas de trabajo en este sentido apuntan hacia chip de sílice o de radiofrecuencias.

3. CULTIVO DE GAMETOS Y EMBRIONES

La mejora en las condiciones de cultivo de gametos y embriones serán a dos niveles en los componentes de los medios de cultivo y en el soporte donde se realiza el cultivo. En el primer campo, se desarrollaran medios con la adición de factores de crecimiento. Actualmente ya se comercializan medios con GM-CSF, otros factores candidatos a incorporarse a estos medios son LIF, PAF, IGF-I y II. También se producirán medios que reduzcan la concentración de sustancias nocivas para el desarrollo embrionario como TNF alpha e IFN gamma. En este sentido, existen ya medios con moléculas con actividad antioxidante para mejorar la criopreservación espermática.

Pero independientemente del medio de cultivo, será fundamental la estabilidad de las condiciones de cultivo (temperatura, atmosfera) para lo cual los sistemas de time-lapse (toma

de fotos del embrión cada pocos minutos) que permitan la valoración de los embriones sin tener que cambiar las condiciones de cultivo, sacando los embriones de la incubadora terminaran imponiéndose. En cuanto al modo de cultivar los embriones se incorporaran sistemas basados en microfluidos tanto para selección espermática como para cultivo embrionario, con la intención de asemejarse a las condiciones fisiológicas donde se desarrolla el embrión en la superficie del epitelio tubárico y endometrio.

La implantación definitiva del cultivo prolongado hasta blastocisto tendrá que venir de la mano de evidencias que descarten una influencia negativa de este en la epigenética embrionaria. Actualmente parece claro que para obtener unas tasas de blastocisto adecuadas es necesario el cultivo en atmosferas con una baja tensión de oxígeno (5%). Esta mejora en el cultivo hasta blastocisto podrá permitir reducir el tan temido bloqueo del desarrollo de todos los embriones y por tanto la cancelación de la transferencia. También permitirá reducir el número de crioconservaciones embrionarias seleccionando mejor los embriones a Crioconservar

Por ultimo, será necesario desarrollar estudios aleatorios controlados prospectivos para poder determinar, de una vez por todas, la importancia de otros factores en el cultivo embrionario: cultivo en grupo de embriones o aislado, cultivo en medios secuenciales o medio único.

4.- CRIOCONSERVACION

Tras la revolución que ha supuesto la aparición de la vitrificación en el campo de la medicina reproductiva, permitiendo la aparición de bancos de ovocitos. ésta técnica deberá afrontar otros retos, antes de implantarse en el campo de la crioconservacion espermática como es el volumen de muestra a congelar.

Los bancos de ovocitos han permitido la generalización de los programas de crioconservación de la fertilidad a mujeres en edad reproductiva, que van a recibir tratamientos gonadotóxicos, o para mujeres que desean posponer voluntariamente su maternidad. La crioconservación de tejido testicular o corteza ovárica en pacientes, y especialmente en prepúberes, sometidos a tratamientos gonadotóxicos, también es una realidad en muchos centros, aunque actualmente estas técnicas son consideradas experimentales.

Las altas supervivencias embrionarias tras la vitrificación han hecho que se estén implantando en los centros de reproducción políticas como la de posponer el transfer a ciclos posteriores donde el endometrio no está sometido al desbalance hormonal que produce la estimulación ovárica (transfer diferido). También ha favorecido la implantación de la transferencia de embrión único electiva (eSET), pues se obtienen tasas de gestación similares tras transferencias de dos embriones que de una transferencias de un embrión en fresco y en un ciclo posterior (si no ha habido embarazo) una transferencia de un embrión vitrificado.

5. AUTOMATIZACIÓN

Los comentados sistemas de microfluidos permitirán la automatización de la selección espermática y el posicionamiento de los ovocitos para la ICSI. La microinyección automática de estos ovocitos se realizará gracias al empleo de microsensores de presión. Estos rodearán al ovocito a modo de columnas detectando cualquier deformación por presión en la superficie del ovocito. La carga y descarga del espermatozoide en la pipeta de ICSI mediante microinyectores automatizados que regularán la aspiración del espermatozoide y su inyección.

Pero la automatización no solo está alcanzando a la ICSI sino también a la criopreservación de gametos y embriones. Actualmente existen ya plataforma de rellenado, sellado y etiquetado de pajuelas de semen. Por otro lado, el sistema GABI realiza la vitrificación automática de embriones. También la selección embrionaria será automática basada en sistemas de morfocinética (time-lapse). Actualmente son varios las plataformas de este tipo en el mercado, disponiendo de un algoritmo de selección automática varios de ellos. Para la difusión de estas tecnologías es clave la estandarización no solo de las condiciones de cultivo (exposición a luz, materiales de las placas, tamaño de pocillos) sino de las variables a analizar. Será clave encontrar parámetros morfocinéticos reproducibles entre centros, pues los modelos propuestos hasta ahora han mostrado escasa validez externa.

En próximos años veremos estas plataformas incorporar simultáneamente la evaluación de parámetros morfocinéticos con la de parámetros bioinformáticos ("ómicas"). Todos estos avances permitirán una mayor implantación de la transferencia de embrión único. Queremos destacar aquí lo difícil que está resultando la implantación clínica de estas tecnologías pues aún desconocemos el comportamiento natural del embrión en sus primeros estadios. En este sentido cabe destacar la teoría del embrión "tranquilo" en la cual no es más viable el embrión que tiene un metabolismo más activo, si no el embrión que aprovecha sus recursos endógenos, y que presenta una baja actividad metabólica, con un escaso turnover de aminoácidos. Definir que marcadores "ómicos" definen al embrión "in vitro" de baja actividad metabólica está aún por averiguar.

6. SEGURIDAD

El aumento en la seguridad en laboratorio de crioconservación pasará por la implantación de sistemas de esterilización de nitrógeno líquido que reduzcan significativamente el riesgo de contaminación cruzada durante el almacenamiento. También serán fundamentales los comentados sistema de codificación en la disminución de la probabilidad de errores en la identificación de muestras.

Las diferentes leyes sobre reproducción asistida hablan de la creación de un sistemas oficial de biovigilancia que permita la coordinación en esta materia. Aunque actualmente se reporta a la autoridad sanitaria competente de manera retrospectiva los eventos y efectos adversos, en el futuro estas comunicaciones deberán realizarse de manera on line, y en el momento de suceder, de tal manera que permitan una gestión de la seguridad.

7. DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL (DGP)

El futuro del DGP es evidente que es del DGP en blastocisto, pues el daño causado por la biopsia de blastómeras en día tres desaparece al realizarla en esta etapa, y además permite obtener más DNA. Las nuevas técnicas de biología molecular (secuenciación masiva, NGS) permitirán ampliar el panel de enfermedades genéticas y analizar los 23 pares de cromosomas al mismo tiempo. Además reducen el tiempo de respuesta, lo que permitirá la realización de biopsias de blastocistos y poder realizar transfer en fresco sin problemas. No debemos olvidarnos del futuro del DGP no invasivo basado en el análisis del líquido del blastocele.

8. SCREENING GENÉTICO A DONANTES Y PAREJAS

La posibilidad de realizar estudio de portadores a bajo costes de un gran número de enfermedades, permite realizar un adecuado consejo preconcepcional genético a parejas que quieran disminuir el riesgo de tener hijos afectados de enfermedades genéticas. La generalización de estos test no estará exenta de dilemas éticos, como por ejemplo, si en un futuro será ético asumir el riesgo de tener un hijo con una enfermedad genética cuando pudo haberse evitado (9).

Cuando se detecta que receptora y donante de semen (o donante de ovocitos y varón de la pareja receptora) son portadores de mutaciones de la misma enfermedad recesiva, se puede cambiar de donante y ajustar el perfil genético de ambos de tal manera que no coincidan en las enfermedades autosómicas recesivas que son portadores (matching genético). Sin embargo, la aplicación de estas técnicas a programas de donación de gametos presenta ciertas peculiaridades a resolver en el futuro. Entre estas se encuentra, el adecuado consejo genético pre-test a los donantes y la actitud a tomar ante el conocimiento de que un donante es portador de varias mutaciones de enfermedades genéticas recesivas. Durante años cuando nacía un niño afecto de una enfermedad genética recesiva tras la utilización de un gameto de donante, ese donante no era usado más veces dado su estado de portador. Realizar esto en un futuro tras el estudio masivo de portadores de enfermedades genéticas llevará a conflictos éticos de difícil solución, pues todas las personas son portadoras de varias mutaciones de enfermedades genéticas recesivas.

9. GLOBALIZACIÓN

Las técnicas de reproducción asistida no serán ajenas a la globalización. Esta repercutirá en varios aspectos como la aplicación de estas técnicas a parejas de diferentes países (turismo reproductivo) o el número máximo de hijos nacidos por donante. Todos los modelos de riesgos de consanguineidad entre nacidos del mismo donante sugieren que este riesgo empieza a ser significativo por encima de 200 recién nacidos por donante. En un mundo donde los gametos pueden cruzar fronteras, otros factores (psicológicos, éticos, etc) serán los que deban influir en el límite de nacidos vivos por donante. Careciendo de sentido limitaciones, como la actual de la ley española, de 6 nacidos vivos por donante.

En un mundo de información globalizada es fundamental poseer fuentes de información válidas y fiables. Para ello el papel de los diferentes registros de actividad en este campo será fundamental. Pues permitirán no solo monitorizar los avances en este campo, si no también ayudaran a la toma de decisiones de las parejas y usuarias. En España, el único registro de actividad de técnicas de reproducción humana asistida es el registro de la SEF. Actualmente la participación en este registro es obligatoria para todos los centros españoles desde el año 2016. Los datos de este registro son reportados a sociedades científicas y autoridades sanitarias españolas y europeas.

Por último, el futuro del laboratorio de embriología debe de permitir una mejora en la accesibilidad a las técnicas de reproducción asistida en países en vías de desarrollo. Actualmente, la ESHRE tiene en marcha iniciativas en este sentido que han permitido abaratar los costes de estas técnicas, permitiendo la realización de FIV sin necesidad de las costosas incubadoras de CO₂.

Antes de finalizar este tema, es importante destacar que como demuestran los comentados registros de actividad internacionales, a pesar de existir significativos avances en el campo del laboratorio de reproducción y medicación, las tasas de gestación no solo no se han disparado, si no que apenas han aumentado, en los últimos años. Este hecho es debido a que los avances en resultados clínicos en reproducción asistida (porcentaje de niño nacido en casa) depende en gran medida de las condiciones clínicas de los pacientes. Desafortunadamente estas han empeorado en los últimos años debido al estilo de vida occidental (retraso en la edad de la maternidad, dieta, obesidad, drogas, etc). Por lo que en el futuro será clave explicar a la sociedad que la reproducción asistida no es la solución al problema de la epidemia creciente de la esterilidad, si no la prevención. Las sociedades científicas, la autoridad sanitaria y los profesionales son y serán responsables de explicar las consecuencias de estos hábitos y el gran impacto negativo que tiene, no solo en los deseos reproductivos de las parejas, sino en la sociedad en general.

BIBLIOGRAFÍA

Bonde P, Pennings G, Sterckx S, et al. Is there a moral obligation to conceive children under the best possible conditions? A preliminary framework for identifying the preconception responsibilities of potential parents. *BMC MedEthics*. 2014;22;15:5.

DIRECTIVA (UE) 2015/565 DE LA COMISIÓN de 8 de abril de 2015 por la que se modifica la Directiva 2006/86/CE en lo relativo a determinados requisitos técnicos para la codificación de células y tejidos humanos. *Diario Oficial de la Unión Europea* L 93/43

Kaser DJ, Racowsky C, et al. Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review. *Clinical Hum Reprod Update*. 2014; 20:617-31.

Lu Z1, Zhang X, Leung C, Esfandiari N, Casper RF, Sun Y, et al. Robotic ICSI (intracytoplasmic sperm injection). *IEEE TransBiomedEng*. 2011;58:2102-8.

Mantilla A, Orozco I, Zamora S, Ortiz N, Prados F, Moreno JM, Ardoy M, Eibert M, Marina F, Vilchez MA, González-Útor A, Castilla JA. Grupo de interés de calidad de ASEBIR: Actualización de las especificaciones para los indicadores de calidad de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR). *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica* 2015;2,46-54.

Novo S, Barrios L, Santaló J, Gómez-Martínez R, Duch M, Esteve J, et al. A novel embryo identification system by direct tagging of mouse embryos using silicon-based barcodes. *HumReprod*. 2011;26:96-105.

Novo S, Nogués C, Penon O, Barrios L, Santaló J, Gómez-Martínez R, et al. Barcode tagging of human oocytes and embryos to prevent mix-ups in assisted reproduction technologies. *Hum Reprod*. 2014;29:18-28.

Palini S1, Galluzzi L, De Stefani S, Bianchi M, Wells D, Magnani M, Bulletti C, et al. Genomic DNA in human blastocoele fluid. *ReprodBiomed Online*. 2013;26:603-10.

Prados F, Vidal E, Hernández J, Marqueta J, Herrero J, Cabello Y, de los Santos MJ, Buxaderas R, Segura A, Zamora S, de Andrés M, Cuevas I, Castilla JA. Registro de fecundación in vitro e inyección espermática intracitoplasmática de la Sociedad Española de Fertilidad de los años 2010 y 2011. *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica* 2014;1:33-42

Roy TK, Brandi S, Tappe NM, Bradley CK, Vom E, Henderson C, et al. Embryo vitrification using a novel semi-automated closed system yields in vitro outcomes equivalent to the manual Cryotop method. *Hum Reprod*. 2014;29:2431-8.

Vergouw CG, Heymans MW, Hardarson T, Sfontouris IA, Economou KA, Ahlström A, et al. No evidence that embryo selection by near-infrared spectroscopy in addition to morphology is able to improve live birth rates: results from an individual patient data meta-analysis. *Hum Reprod*. 2014;29:455-61.

Wang C1, Tsai MY, Lee MH, Huang SY, Kao CH, Ho HN, Hsiao CK, et al. Maximum number of live births per donor in artificial insemination. *HumReprod.* 2007;22:1363-72.

Zamora S, de Andrés M, Herrero J, Cabello Y, Prados F, Vidal E, Hernández J, Marqueta J, de los Santos MJ, Buxaderas R, Segura A, Cuevas I, Castilla JA. Registro de inseminaciones intrauterinas (conyugales y de donante) de la Sociedad Española de Fertilidad. Años 2010 y 2011. *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica* 2014;1:43-49

Zhang X1, Leung C, Lu Z, Esfandiari N, Casper RF, Sun Y, et al. Controlled aspiration and positioning of biological cells in a micropipette. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2012;59:1032-40.

COMISIÓN DE ANDROLOGÍA Y TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Presidenta: Inmaculada García Cobaleda (2013)

Miembros: Guadalupe Bueno Rodríguez, Jose Antonio Castilla Alcalá, Maria Isabel Jiménez García, María Dolores Lozano Arana, Joan de Monserrat Vallvé, José Manuel Moreno Cebeira, Cristina Sánchez Pozo (Coordinadora), Isabel Sánchez Prieto

Residentes: Covadonga de Miguel Fernández-Miranda, Tamara Rodríguez Pérez

ACTIVIDADES FORMATIVAS DEL COMITÉ DE EDUCACIÓN

D. Balsells, B. Battikhi (Residente), R. Deulofeu, M. Gassó, N. Giménez, A. Merino, A. Moreno, A. Peña (Residente), N. Rico, M. Rodríguez (Presidente), MC. Villà.

ISSN 1887-6463 – Junio 2017 (recibido para publicación Mayo 2016).