

REVISTA

## ASEBIR

20-22  
NOVIEMBRE

## VII CONGRESO

SEVILLA 2013 CENTRO DE CONVENCIONES GRAN SEVILLA

**EDITORIAL / PROGRAMA CIENTÍFICO CONGRESO ASEBIR / SESIÓN DE ANDROLOGÍA** Estado actual del Grupo de Interés de Andrología / Nuevos métodos de selección espermática (IMSI y MACS): ¿Por qué, cuándo, cómo y para quién? / Significado de las vacuolas espermáticas y su relación con las TRA / **SESIÓN DE EMBRIOLOGÍA** Estado actual del Grupo de Interés de Embriología / Compatibilidad de la clasificación de ASEBIR con la clasificación de time-lapse / Fallo en activación ovocitaria ¿Ovocito o espermatozoide? / **SESIÓN DE CALIDAD** Estado actual del Grupo de Interés de Calidad del Laboratorio de Reproducción Asistida / Conceptos de la nueva Norma Sectorial UNE 179007 para el laboratorio de FIV / Cultivo embrionario: Medios y condiciones biofísicas / **SESIÓN DE GENÉTICA** Estado actual del Grupo de Interés de Genética y Reproducción / Implicaciones éticas y legales de los tests genéticos / Herramientas Bioinformáticas / **ASPECTOS RELEVANTES DE LA SALUD DE LOS EMBRIÓLOGOS CLÍNICOS / DE LA INVESTIGACIÓN A LA APLICACIÓN CLÍNICA** Transcriptómica de la infertilidad masculina: ¿Cuál es la aplicación clínica? / Metabólica y selección embrionaria ¿estamos preparados? / **DEBATE** ¿Qué espera un Ginecólogo de un Embriólogo Clínico? / ¿Qué espera un Embriólogo Clínico de un Ginecólogo? / **EXPOSICIÓN PREMIOS ASEBIR-EMB 2011** Reducir los Errores en FIV: Witnessing Electrónico / El DGP Molecular Combinado con Microarrays de CGH: Una Nueva Estrategia Diagnóstica / **COMUNICACIONES ORALES / COMUNICACIONES PÓSTER**

ASEBİR

# ASEBIR

SUMARIO	Pág.
<b>EDITORIAL</b>	<b>2</b>
Manuel Arday Vilches y Antonio L. González-Utor	
<b>PROGRAMA CIENTÍFICO CONGRESO ASEBIR</b>	<b>4</b>
<b>SESIÓN DE ANDROLOGÍA</b>	<b>12</b>
Estado actual del Grupo de Interés de Andrología Alberto Pacheco Castro	
Nuevos métodos de selección espermática (IMSI y MACS): ¿Por qué, cuándo, cómo y para quién? Juan Álvarez	
Significado de las vacuolas espermáticas y su relación con las TRA Giovanni Ruvolo	
<b>SESIÓN DE EMBRIOLOGÍA</b>	<b>18</b>
Estado actual del Grupo de Interés de Embriología M <sup>a</sup> José De los Santos	
Compatibilidad de la clasificación de ASEBIR con la clasificación de time-lapse Marcos Meseguer Escrivá	
Fallo en activación ovocitaria ¿Ovocito o espermatozoide? Alan Thornhill	
<b>SESIÓN DE CALIDAD</b>	<b>28</b>
Estado actual del Grupo de Interés de Calidad del Laboratorio de Reproducción Asistida Antonio González-Utor	
Conceptos de la nueva Norma Sectorial UNE 179007 para el laboratorio de FIV Nereyda Ortiz Piñate	
Cultivo embrionario: Medios y condiciones biofísicas Gloria Calderón de Oya	
<b>SESIÓN DE GENÉTICA</b>	<b>35</b>
Estado actual del Grupo de Interés de Genética y Reproducción Esther Velilla García	
Implicaciones éticas y legales de los tests genéticos Josep Santaló Pedro	
Herramientas Bioinformáticas Ivo Gut	
<b>ASPECTOS RELEVANTES DE LA SALUD DE LOS EMBRIÓLOGOS CLÍNICOS</b>	<b>45</b>
Pilar Jimena Moro	
<b>DE LA INVESTIGACIÓN A LA APLICACIÓN CLÍNICA...</b>	<b>54</b>
Transcriptómica de la infertilidad masculina: ¿Cuál es la aplicación clínica? Sandra García Herrero	
Metabólica y selección embrionaria ¿estamos preparados? Ana Busquets Bonet	
<b>DEBATE</b>	<b>64</b>
¿Qué espera un Ginecólogo de un Embriólogo Clínico? Antonio Gosálvez Vega	
¿Qué espera un Embriólogo Clínico de un Ginecólogo? Fernando J. Prados Mondéjar	
<b>EXPOSICIÓN PREMIOS ASEBIR-EMB 2011</b>	<b>72</b>
Reducir los Errores en FIV: Witnessing Electrónico Xavier Orriols Brunetti	
El DGP Molecular Combinado con Microarrays de CGH: Una Nueva Estrategia Diagnóstica Xavier Vendrell Montón	
<b>COMUNICACIONES ORALES</b>	<b>83</b>
<b>COMUNICACIONES PÓSTER</b>	<b>109</b>

## Diciembre 2013 Vol. 18 N°2

### EDITA

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

### EDITORES Y DIRECTORES CIENTÍFICOS

Dra. Marga Esbert Algam  
IVI BARCELONA, Barcelona

Dr. Jorge Cuadros Fernández  
CLÍNICA FIVMADRID, Madrid

### COMITÉ EDITORIAL

#### Presidente:

Dr. Manuel Arday Vilches  
HOSPITAL UNIVERSITARIO GREGORIO MARAÑÓN - Madrid

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

Dra. Carmen Ochoa Marieta  
CER. CLINICA COTERO - Santander

#### Secretaría, Publicaciones:

Dra. Montserrat Boada Palá  
INSTITUT UNIVERSITARI DEXEUS - Barcelona

#### Tesorería y Relaciones con la Industria:

Dr. Fernando Marina Rugero  
INSTITUTO DE REPRODUCCION CEFER - Barcelona

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

Dr. Josep Santaló Pedro  
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA - Bellaterra

#### Vocalía de Congresos y Certificación ASEBIR:

Dra. Yolanda Mínguez Royo  
IVI MADRID - Madrid

#### Vocalía de Docencia y Formación Continuada:

Dra. M<sup>a</sup> José Torello Ybañez  
HOSPITAL QUIRÓN, Barcelona

Dr. Ignacio Santiago Álvarez Miguel

INST. EXTREMEÑO REPRODUCCIÓN ASISTIDA -IERA -Badajoz

Dr. Juan Manuel Moreno García  
CLINICA VISTAHERMOSA, Alicante

Dra. Marga Esbert Algam  
IVI BARCELONA, Barcelona

#### Vocalía Página Web:

Dr. Juan Manuel Moreno García  
CLINICA VISTAHERMOSA - Alicante

#### Vocalía de Publicaciones:

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

Dra. Marga Esbert Algam  
IVI BARCELONA, Barcelona

Dra. Montserrat Boada Palá  
INSTITUT UNIVERSITARI DEXEUS, Barcelona

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

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

### PUBLICIDAD Y COLABORACIONES

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

### DISEÑO, MAQUETACIÓN E IMPRESIÓN

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

## Estimados/as Compañeros/as:

En nombre de todo el Comité Científico y Organizador y de la Junta Directiva de ASEBIR, es un placer poder daros la bienvenida a Sevilla, a nuestro Congreso y a la celebración del 20 aniversario de ASEBIR.

Durante estos años hemos crecido: ya somos casi 800 socios. Hemos ganado en experiencia, siendo este nuestro séptimo congreso, y seguimos con la misma ilusión y ganas de trabajar para hacer de ASEBIR un referente en el ámbito de la biología de la reproducción y de su congreso un referente científico y del trabajo bien hecho.

Los Comités Organizador y Científico han trabajado para hacer un programa que responda a los retos de nuestra especialidad y que permita el intercambio de información científica y profesional entre todas las áreas de conocimiento que se hermanan en nuestra asociación, por lo que les estamos muy agradecidos.

Queremos agradecer de forma especial el apoyo de las empresas proveedoras. Este respaldo es imprescindible para la realidad del Congreso. Su colaboración continua con ASEBIR es muy importante y siempre agradecida por nuestra parte.

Gracias a todos los que habéis presentado comunicaciones. 208 trabajos presentados son más que un record con respecto a otras ediciones: dicen mucho de vuestro interés y compromiso con ASEBIR y nuestra especialidad.

Gracias a todos los que habéis asistido al Congreso y también a los que os habéis quedado atendiendo el laboratorio de vuestra Unidad.

Gracias a los ponentes y moderadores. Vuestras aportaciones y rigor son garantía de éxito para el Congreso.

Esperamos que en estos días disfrutéis de las charlas, de los intercambios científicos, de los reencuentros con los colegas y amigos. Y por supuesto de Sevilla. Muchas y diferentes culturas han estado presentes en su historia. Su legado ha conformado



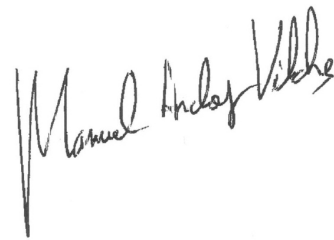
a lo largo de siglos el patrimonio cultural y artístico que podréis admirar en sus monumentos, plazas, calles y museos. Una bella ciudad distinguida por su privilegiado clima y el carácter acogedor de sus gentes.

Se dice que Sevilla enamora, cuando finalice el congreso, podréis comprobar que esto es cierto.

¡Bienvenidos!



Dr. Antonio L. González Utor  
Presidente Comité Organizador



Dr. Manuel Ardoy Vilches  
Presidente de ASEBIR

## Continuous Single Culture™ Media

Desde la fertilización hasta el día 5/6 de desarrollo

Sin cambios,  
sin stress

CE  
0050



DISTRIBUIDO POR:



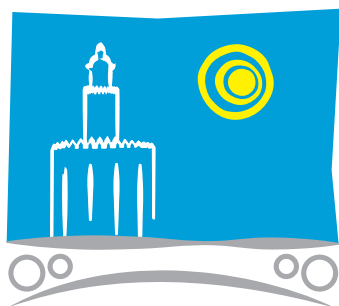
IZASA



IrvineScientific®

[www.izasa.es](http://www.izasa.es)

Atención al Cliente: 902 20 30 90



# ASEBIR

## VII CONGRESO SEVILLA 2013

### COMITÉ DE HONOR

**Excma. Sra. Doña Ana Mato Adrover**  
Ministra de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad

**Excma. Sra. Doña Susana Díaz Pacheco**  
Presidenta de la Junta de Andalucía

**Honorable Sra. Doña María Jesús Montero Cuadrado**  
Consejería de Salud y Bienestar Social de la Junta de Andalucía

**Ilmo. Sr. D. Juan Ignacio Zoido Álvarez**  
Alcalde de Sevilla

**Doctor D. Antonio Ramírez de Arellano López**  
Rector Magnífico de la Universidad de Sevilla

**Sr. D. Vicente C. Guzmán Fluja**  
Rector Magnífico de la Universidad Pablo Olavide de Sevilla

**Sr. D. Eduardo Morán Fagúndez**  
Decano del Colegio Oficial de Biólogos de Andalucía

**Dra. Dña. Anna Veiga Lluch**  
Socia Fundadora de ASEBIR  
Presidenta de la Asociación del año 1993 al 2003  
En la actualidad Presidenta de la ESHRE

**Dr. D. Carlos Javier González-Vilardell Urbano**  
Presidente del Real e Ilustre Colegio de Médicos de Sevilla

**Sr. D. Manuel Pérez Fernández**  
Presidente del Real e Ilustre Colegio Oficial de Farmacéuticos de Sevilla

## COMITÉ ORGANIZADOR

### PRESIDENTE

Antonio L. González Utor

### VOCALES

Sonia Calderón Rodríguez

José Antonio Castilla Alcalá

Luisa Díaz García

Rocío Díaz Giraldez

Miguel Gañán Parra

María Hebles Duvison

M<sup>a</sup> Victoria Hurtado de Mendoza y Acosta

M<sup>a</sup> Dolores Lozano Arana

Lorena Montero Venegas

Nicolás Prados Dodd

Beatriz Sánchez Andujar

M<sup>a</sup> Cristina Sánchez Pozo

M<sup>o</sup> José Torelló Ybáñez

## COMITÉ CIENTÍFICO

### PRESIDENTE

Antonio L. González Utor

### VOCALES

Ignacio Santiago Álvarez Miguel

Carmen Anarte Jimeno

M<sup>a</sup> Teresa Cañete Reina

M<sup>a</sup> José de los Santos Molina

M<sup>a</sup> José Gómez Cuesta

Lourdes López Yáñez

Laura Marqués Soler

Yolanda Mínguez Royo

José Ramón Ortiz de Galisteo Cifuentes

Agueda Ortiz Ruiz

Alberto Pacheco Castro

Lourdes Sánchez Castro

Esther Velilla García

Sandra Zamora López



SECRETARÍA TÉCNICA GRUPO PROCESS

Betaprocess, S.L.

C/ Cronos, 20, Bloque 4, 1º, 6ª - Madrid 28037

Tel.: +34 91 377 14 23/ Fax: +34 91 377 49 65

E-mail: info@congresoasebir.es

## CRÉDITOS Y AUSPICIOS

Actividad **Acreditada** con fecha 4 de junio de 2013 por la Dirección General de Calidad, Investigación, Desarrollo e Innovación de la Consejería de Salud y Bienestar Social de Andalucía con 1.04 créditos (Actividad de Formación Continuada registrada con el número UJK0146\_00).



## CONGRESO AUSPICiado POR



Sociedad Española de Contracepción (SEC)



Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva (ASESA)



Sociedad Española de Fertilidad (S.E.F.)



Asociación Española de Biotecnología Médica (AEBM)



La Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO)

## CURSOS PRECONGRESO

### MIÉRCOLES, 20 DE NOVIEMBRE DE 2013

Nº 1 - Curso teórico-práctico de citometría de flujo aplicada al análisis seminal

Nº 2 - El papel del técnico en los laboratorios de reproducción asistida

Nº 3 - Curso de autores e investigadores en embriología clínica

Nº 4 - Taller interactivo de genética reproductiva

- Charla abierta del control de calidad e indicadores de ASEBIR

## PROGRAMA CIENTÍFICO

### MIÉRCOLES, 20 DE NOVIEMBRE DE 2013

**15:00 - 20:00 hrs. Apertura de secretaría**

**16:00 - 17:00 hrs. Inauguración oficial del VII Congreso Nacional ASEBIR.**

**17:00 - 18:40 hrs. Sesión de Andrología**

*Moderadora: M<sup>a</sup> Victoria Hurtado de Mendoza Acosta, MásVida Reproducción, Sevilla*

**- Estado actual del Grupo de Interés de Andrología**

*Ponente: Alberto Pacheco Castro, IVI Madrid, Madrid*

**- Nuevos métodos de selección espermática (IMSI y MACS):**

**¿Por qué, cuándo, cómo y para quién?**

*Ponente: Juan Álvarez, Androgen, La Coruña*

**- Significado de las vacuolas espermáticas y su relación con las TRA**

*Ponente: Giovanni Ruvolo, Centro di Biologia della Riproduzione, Palermo, Italy*

**18:40 - 19:40 hrs. Comunicaciones Orales Andrología**

*Moderador: José Ramón Ortiz de Galisteo, Instituto Extremeño de Reproducción Asistida, Badajoz*

**O-001 - Estudio de informatividad en espermatozoides únicos: la mejor estrategia para DGP de mutaciones de novo en el varón**

*R. Bautista-Llácer; E. García-Mengual; T. Alberola; M. Pardo; E. Raga; C. Sánchez-Matamoros; X. Vendrell.*

*Sistemas Genómicos, Laboratorio de DGP molecular, Paterna (Valencia).*

**O-002 - Melatonina y calidad espermática. Estudio In Vitro**

*F. Monllor<sup>1</sup>; I. Bejarano<sup>2</sup>; G. Lozano<sup>1</sup>; A. Ortiz<sup>1</sup>; MI. Jiménez<sup>1</sup>; A. Marchena<sup>2</sup>; J. Espino<sup>2</sup>; F. Malpartida<sup>1</sup>; P. Gaspar<sup>1</sup>; JA. Pariente<sup>2</sup>; A. Rodríguez<sup>2</sup>.*

<sup>1</sup>Centro Extremeño de Reproducción Humana Asistida (CERHA).

<sup>2</sup>Departamento de Fisiología. Universidad de Extremadura.

**O-003 - En busca de marcadores de resistencia al criodaño espermático**

*E. Sellés; S. García-Herrero; J.A. Martínez; M. Muñoz; M. Meseguer; N. Garrido.*

*IVI Alicante, IVI Valencia.*

**O-004 - Diferencias en el metiloma de espermatozoides entre individuos fértiles e infértiles**

*C. Camprubí<sup>1</sup>, G. Castellano<sup>2</sup>, M. Grossmann<sup>3</sup>, N. Garrido<sup>4</sup>, MC. Pons<sup>3</sup>, I. Martin-Subero<sup>2</sup>, J. Blanco<sup>1</sup>.*

<sup>1</sup>Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona.

<sup>2</sup>Unidad de Hematopatología, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona.

<sup>3</sup>Unidad de Reproducción Asistida de Centro Médico Teknon, Barcelona.

<sup>4</sup>Laboratorio de Andrología y Banco de Semen, Instituto Universitario IVI Valencia, Valencia.

**O-005 - Etiquetaje directo de muestra seminal humana con microcódigos de polisilicio**

*S. Novo<sup>1</sup>, I. Mora-Espí<sup>1</sup>, L. Barrios<sup>1</sup>, E. Ibáñez<sup>1</sup>, R. Gómez-Martínez<sup>2</sup>, J. Esteve<sup>2</sup>, J.A. Plaza<sup>2</sup>, C. Nogués*

<sup>1</sup>Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

<sup>2</sup>Instituto de Microelectrónica de Barcelona IMB-CNM (CSIC), Bellaterra, Spain.

**0-006 - Resultados clínicos de PGS en pacientes con FISH alterado en espermatozoides: comparación entre FISH 9 sondas VS CGH Array**

*P. Muñoz-Soriano, E. Ferrer-Robles, M. Ferrer-Buitrago, C. Calatayud-Lliso, M. Ruiz-Jorro CREA. Centro médico de Reproducción Asistida. Valencia.*

**20:15 hrs. Cocktail Inaugural**

**JUEVES, 21 DE NOVIEMBRE DE 2013**

**08:00 - 14:00 hrs. Apertura de secretaría**

**09:00 - 10:40 hrs. Sesión de Embriología**

*Moderador: Yosú Franco Iriarte, Centro Sanitario Virgen del Pilar, San Sebastian*

**- Estado actual del Grupo de Interés de Embriología**

*Ponente: M<sup>a</sup> José de los Santos Molina, IVI Valencia, Valencia*

**- Compatibilidad de la clasificación de ASEBIR con la clasificación de timelapse**

*Ponente: Marcos Meseguer Escrivá, IVI Valencia, Valencia*

**- Fallo en activación ovocitaria ¿Ovocito o espermatozoide?**

*Ponente: Alan Thornhil, Guy's Hospital, London, UK*

**10:40 - 11:15 hrs. Pausa café.**

**11:15 -12:00 hrs. Aspectos relevantes de la salud de los Embriólogos Clínicos**

*Moderadora: M<sup>a</sup> José Gómez Cuesta, Institut Universitari Dexeus, Barcelona*

*Ponente: Pilar Jimena Moro, Centro de Salud de Alfacar, Granada*

**12:00 - 13:00 hrs. Comunicaciones Orales**

*Moderadora: Agueda Ortiz Ruiz, Hospital Materno-Infantil Perfecto Socorro, Badajoz*

**0-007 - Evolución y análisis cromosómico de embriones multinucleados**

*M. Parriego<sup>1</sup>, S. Nadal<sup>1</sup>, M. Boada<sup>1</sup>, D. Tuñón<sup>1</sup>, S. Mateo<sup>1</sup>, B. Coroleu<sup>1</sup>, A. Veiga<sup>1-2</sup>.*

<sup>1</sup> Servicio de Medicina de La Reproducción. Hospital Universitario Quirón Dexeus. Barcelona.

<sup>2</sup> Banc de Línies Cel·lulars. Centre de Medicina Regenerativa. Barcelona.

**0-008 - La contracción de los blastocistos afecta negativamente al éxito reproductivo reduciendo su tasa de implantación; un estudio time-lapse**

*S. Pérez, J. Marcos, M. Moya, T. Vilorio, JL Romero, MJ. De los Santos, M. Meseguer*

*IVI Valencia, Valencia*

**0-009 - Revitrificación: embriones criopreservados procedentes de ovocitos vitrificados.**

*J. Muñoz, A. Silván, M. Toledano, M. Brandt, J. A. García Fernández, E. Garijo, F. Galera.*

*Instituto Madrileño de Fertilidad (IMF), Madrid*

**0-010 - Efecto de la vitrificación ovocitaria en la morfocinética embrionaria**

*J. Herreros, J. Teruel, M. Eibert, N. Costa, A. Ballesteros, M. Florensa*

*IVI Barcelona, Barcelona*

**0-011 - Selección embrionaria morfocinética mediante primo visión en un programa de transferencia electiva de embrión único.**

*A. Clavero; MC. Gonzalvo; ML. López; S. Carrillo; M. Rodríguez; L. Martínez; JA. Castilla.*

*Hospital Universitario Virgen de la Nieves, Granada*

**0-012 - Valoración del efecto de la concentración de oxígeno en la morfocinética embrionaria durante el cultivo a blastocisto**

*M. Martínez Burgos, C. Losada, C. López, D. Becerra, D. Agudo, F. Bronet.*

*IVI Madrid. Aravaca, Madrid*



**13:00 - 14:00 hrs. Symposium Satélite Equipos Médico-Biológicos, S.L.**

**Time-lapse by Vitrolife:**

- **Time-lapse in routine embryology: new ways of embryo evaluation, culture and documentation**

*Ponente: Csaba Pribenszky, PhD, Scientific manager, Vitrolife kft. Hungary*

- **Does time-lapse monitoring improve clinical outcome? A prospective randomised study**

*Ponente: Peter Kovacs, MD, PhD, Medical director, Kaali Institutes, Budapest, Hungary.*

**14:00 - 15:30 hrs. Comida congresual**

**15:00 - 19:30 hrs. Apertura de secretaría**

**15:30 - 17:10 hrs. Sesión de Calidad**

*Moderadora: Yolanda Mínguez Royo, IVI Madrid, Aravaca, Madrid*

- **Estado actual del Grupo de Interés de Calidad del Laboratorio de Reproducción Asistida**

*Ponente: Antonio L. González Utor, MásVida Reproducción, Sevilla*

- **Conceptos de la nueva Norma Sectorial UNE 179007 para el laboratorio de FIV**

*Ponente: Nereyda Ortiz Piñate, Clínica Inst. Europeo De Fertilidad, Madrid*

- **Cultivo embrionario: Medios y condiciones biofísicas**

*Ponente: Gloria Calderón de Oya, Embryotools, Barcelona*

**17:10 - 17:40 hrs. Pausa café.**

**17:40 - 18:40 hrs. Comunicaciones Orales de Calidad del Laboratorio de Reproducción Asistida**

*Moderadora: Sandra Zamora López, CEIFER, Granada*

- O-013 - Evaluación de la capacidad predictiva de implantación de marcadores morfo - cinéticos tempranos.**

*M. Pigni; F. Gracia; L. M. R. Menes; P. Duque; V. Sánchez; J. Quintana; E. García; P. De la Fuente; C. García-Ochoa*

*CEFIVA, Oviedo*

- O-014 - Criotransferencia de embrión único: ¿es necesaria? ¿es eficaz?**

*JA, Castilla Alcalá; S, Carrillo; A, Clavero; B, López; M, Serrano; I, Orozco; A, Mantilla; MA, Calderón.*

*Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada*

- O-015 - Determinación del perfil metabolómico del medio de cultivo embrionario como posible marcador no invasivo de calidad embrionaria mediante resonancia magnética nuclear (RMN)**

*I. Cuevas<sup>1</sup>; A. Sáez<sup>1</sup>; A. Coello<sup>1</sup>; J.M. Morales<sup>2</sup>; D. Monleón<sup>3</sup>; C. Olmedo<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Unidad de Reproducción Humana. Hospital General Universitario de Valencia. Valencia.

<sup>2</sup> Unidad Central de Investigación en Medicina- INCLIVA.

<sup>3</sup> Fundación del Hospital Clínico de Valencia -INCLIVA

- O-016 - Valoración del crecimiento y desarrollo psicomotor en niños de 1 a 6 años nacidos tras vitrificación embrionaria**

*M. Ferrer-Buitrago<sup>1-2</sup>, P. Muñoz-Soriano<sup>1-2</sup>, E. Ferrer-Robles<sup>1-2</sup>, J. López-Camarasa.<sup>3</sup>, Muñoz-García, M. Ruiz-Jorro<sup>1-2</sup>, C. Calatayud-Lliso<sup>1-2</sup>*

<sup>1</sup> CREA. Centro médico de reproducción asistida, Valencia.

<sup>2</sup> ANACER. Asociación nacional de clínicas de reproducción asistida.

<sup>3</sup> Equipo de pediatría del Centre de Salut de Sueca. Valencia.

**0-017 - Eficacia de una política de transferencia embrionaria única con criotransferencia de embrión único: ¿es posible su implantación en el sistema sanitario público?**

*ML. López Regalado; A. Clavero; MC. Gonzalvo; S. Carrillo; B. López; M. Serrano; I. Orozco; M. Rodríguez.*

*Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada*

**0-018 - Prevalencia de los polimorfismos cromosómicos en pacientes infértiles y su efecto en los resultados de los ciclos FIV.**

*R. Morales; B. Lledo; J.A. Ortiz; J. Ten; J. Llacer; R. Bernabeu.*

*Instituto Bernabeu Biotech, Alicante*

## VIERNES, 22 DE NOVIEMBRE DE 2013

**08:00 - 14:00 hrs. Apertura de secretaría**

**09:00 - 10:40 hrs. Sesión de Genética y Reproducción**

*Moderador: M<sup>a</sup> José Torello Ybáñez, Clínica Quirón, Barcelona*

**- Estado actual del Grupo de Interés de Genética y Reproducción**

*Ponente: Esther Velilla García, Institut Marques, Barcelona*

**- Implicaciones éticas y legales de los tests genéticos**

*Ponente: Josep Santaló Pedro, UAB, Bellaterra, Barcelona*

**- Herramientas Bioinformáticas**

*Ponente: Ivo Gut, Centro Nacional de Análisis Genómico, Barcelona*

**10:40 - 11:15 hrs. Pausa café**

**11:15 - 12:15 hrs. Comunicaciones Orales**

*Moderadora: Lourdes Sánchez Castro, Hospital Central de Asturias, Oviedo*

**0-019 - El tipo de anomalía cromosómica afecta al tiempo de división embrionaria**

*M C Nogales<sup>1</sup>; M. Florensa<sup>3</sup>; N. Basile<sup>1</sup>; M. Ariza<sup>1</sup>; E. Martínez<sup>1</sup>; D. Agudo<sup>1</sup>; M. Meseguer<sup>2</sup>; F. Bronet<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *IVI Madrid, Aravaca (Madrid).*

<sup>2</sup> *IVI Valencia, Valencia.*

<sup>3</sup> *IVI Barcelona, Barcelona.*

**0-020 - Utilidad clínica del Array-CGH en el diagnóstico genético preimplantacional de parejas portadoras de reordenamientos cromosómicos estructurales: un salto cualitativo**

*E. Fernández<sup>1</sup>; P. Eibes<sup>1</sup>; A. Gómez<sup>1</sup>; A. Obradors<sup>2</sup>; A. Pujol<sup>2</sup>; J. Muñoz<sup>3</sup>; M. Martínez-Fresno<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Geniality Diagnóstico Genético, Madrid;*

<sup>2</sup> *Clínica Eugén, Barcelona;*

<sup>3</sup> *Instituto Madrileño de Fertilidad, Madrid*

**0-021 - Validación de la técnica KARYOLITE-BOBS como método de DGP de Screening de aneuploidías de 24 cromosomas**

*M. Martínez-Fresno; A. Gómez; P. Eibes; E. Sánchez; E. Fernández*

*Geniality Diagnóstico Genético, Madrid*

**0-022 - Genotipado del SNP R72P del gen p53 en pacientes con fallo de implantación y aborto de repetición y su efecto en los resultados de los ciclos de FIV**

*B. Lledo; A. Turienzo; J.A. Ortiz; R. Morales; J. Ten; J. Llacer; R. Bernabeu.*

*Instituto Bernabeu Biotech, Alicante*

**O- 023 - DGP combinado de dos enfermedades monogénicas recesivas: deficiencia de adenosina deaminasa y paraplejia espástica hereditaria tipo 11**

A. Gómez<sup>1</sup>; M. Dorado<sup>2</sup>; P. Sánchez<sup>2</sup>; E. Fernández<sup>1</sup>; M. Martínez-Fresno<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Geniality Diagnóstico Genético, Madrid;

<sup>2</sup> Clínicas Ginemed, Sevilla

**O- 024 - Fiabilidad del DGP para la distrofia muscular facioescapulohumeral por exclusión del haplotipo de riesgo mediante STRs**

C. Arjona; M. Sandalinas; E. García-Guixé; A. Jiménez-Macedo; C. Giménez  
Reprogenetics, Barcelona

**12:15 - 13:00 hrs. Symposium Satélite ORIGIO MEDICULT ESPAÑA S.L.**

**- The role of EmbroyGen in patients with implantation failure and / or miscarriage and clinical results**

Ponente: Dra. Beatrice Dal Canto (Clínica Zucchi BIOGENESI, Monza, Italy)

**13:00 - 14:30 hrs. ASAMBLEA ASEBIR**

**14:30 - 16:00 hrs. Comida congresual**

**15:00 - 19:30 hrs. Apertura de secretaría**

**16:00 - 17:00 hrs. De la Investigación a la Aplicación Clínica....**

Moderador: Jorge Cuadros Fernández, Clínica FIV-Madrid, Madrid

**- Transcriptómica de la infertilidad masculina: ¿Cuál es la aplicación clínica?**

Ponente: Sandra García Herrero, Iviomics, Paterna, Valencia

**- Metabólica y selección embrionaria ¿estamos preparados?**

Ponente: Ana Busquets Bonet.

**17:00 - 17:40 hrs. Debate**

Moderador: Carmen Ochoa Marieta, Clínica Cotero, Santander

**- Qué espera un Ginecólogo de un Embriólogo Clínico?**

Ponente: Antonio Gosálvez Vega, Hospital U. Quirón, Madrid

**- ¿Qué espera un Embriólogo Clínico de un Ginecólogo?**

Ponente: Fernando J. Prados Mondejar, Hospital U. Madrid-Montepríncipe, Madrid

**17:40 - 18:00 hrs. Pausa café**

**18:00 - 18:20 hrs. Exposición Premios ASEBIR-EMB 2011.**

Moderadores: Antonio L. González Utor, Presidente Comité Organizador y Manuel Ardoy Vilches, Presidente ASEBIR

**- Reducir los Errores en FIV: Witnessing Electrónico.**

Ponente: Xavier Orríols Brunetti, The London Bridge Fertility, London

**- El DGP Molecular Combinado con Microarrays de CGH: Una Nueva Estrategia Diagnóstica.**

Ponente: Xavier Vendrell Montón, Sistemas Genómicos, Paterna, Valencia

**18:20 - 19:10 hrs. Exposición Premio ASEBIR al Mejor Póster 2013**

Moderadores: Antonio L. González Utor, Presidente Comité Organizador y Manuel Ardoy Vilches, Presidente ASEBIR

**19:10 - 19:20 hrs. Clausura VII Congreso Nacional ASEBIR 2013**

por parte del Dr. Manuel Ardoy, Presidente de ASEBIR y el Presidente del Comité Organizador, Antonio L. González Utor

**21:30 hrs. Cena de Clausura, anuncio y entrega de los Premios ASEBIR-EMB 2013**

por parte del Sr. Sergio Oliveró, Presidente del grupo EMB y del Presidente de ASEBIR, el Dr. Manuel Ardoy.





 **BioCare**  
E u r o p e

**KITAZATO**<sup>®</sup>



  
**Rocketmedical**



**nunc**<sup>™</sup>

**Panasonic**<sup>®</sup>

**IVFtech**



 **BioCare**  
E u r o p e

Somebody is waiting for  
good news

*BioCare Europe*  
*España / Francia / Grecia / Italia / Portugal / Suiza*  
*Tlfn: 900 99 39 36 - Fax: 954 50 07 69*  
*[www.biocareeurope.com](http://www.biocareeurope.com)*

## ESTADO ACTUAL DEL GRUPO DE INTERÉS DE ANDROLOGÍA

Alberto Pacheco Castro (coordinador del Grupo de Interés)  
[alberto.pacheco@ivi.es](mailto:alberto.pacheco@ivi.es)

El Grupo de Interés de Andrología (GIA) se creó hace algo más de 2 años con el objetivo de incrementar la presencia de la Andrología dentro de la Reproducción asistida, puesto que es una parte fundamental de la misma y siempre ha estado un poco olvidada, y dentro de la propia asociación ASEBIR.

Para ello se formó un grupo de Interés dentro de ASEBIR en el que pudiesen participar y colaborar todas aquellas personas y centros que trabajasen de manera habitual en el campo de la Andrología y/o que quisiesen ayudar a desarrollar y dar a conocer esta área tan importante.

En la actualidad, el grupo de interés está formado por integrantes de importantes centros de reproducción de distintas partes de España (Dexeus, Quirón, Ginefiv, CIRH, IVI, Instituto Marques), y sigue abierto a la participación de todos aquellos que lo deseen.

Los objetivos principales del GIA se dividieron desde el inicio en el desarrollo de 3 áreas diferentes: docencia, clínica e investigación. Y en base a esas áreas, se han ido llevando a cabo distintas actuaciones a lo largo de los últimos dos años.

### ÁREA CLÍNICA

#### *APOYO EN LA IMPLEMENTACIÓN DE NORMATIVAS (REGISTRO DE DONANTES, MANUAL DE REFERENCIA DE LA OMS)*

Uno de los pilares para establecer el diagnóstico del varón es el estudio básico seminal. Esta prueba no solo se realiza en laboratorios de Andrología, especializados en reproducción asistida, sino que también puede ser llevado a cabo por distintos laboratorios generales, o de análisis clínicos. Por ello, es importante la formación continuada en este estudio seminal básico, abierto a todos los tipos de laboratorios que lo pueden realizar. Así, durante los dos últimos años 2011 y 2012 se ha impartido el "CURSO ASEBIR-

AEBM de Análisis Seminal ante los nuevos criterios de la OMS", 1ª y 2ª edición, durante las fechas 27-28 enero de 2011 y 20-21 febrero de 2012 respectivamente. La realización del mismo fue en el Hospital Gregorio Marañón (Madrid) y en ambas convocatorias se completó el nº de participantes, en el que cabe destacar la gran variabilidad de procedencia de los asistentes. En este año, por dificultades de agenda de ASEBIR, no se pudo realizar la 3ª edición, la cual se llevará a cabo durante el primer trimestre del 2014

#### *INTERCAMBIO DE CONOCIMIENTOS CLÍNICOS*

El GIA también ha servido como vehículo para conectar importantes laboratorios de Andrología en España. Fruto de ello, y de la excelente relación entre los biólogos de los diferentes centros, se ha producido un intercambio de información de los diferentes protocolos de laboratorio, técnicas específicas, medios utilizados, etc. Esta interrelación entre los diferentes laboratorios es siempre positiva y puede hacer avanzar en el conocimiento y/o perfeccionamiento de diferentes técnicas.

Asimismo y desde su formación, al grupo de interés han ido llegando por diferentes medios (correos electrónicos, vía telefónica, a través de ASEBIR...) diversas consultas técnicas, sobre protocolos y metodología de trabajo, y legales (relacionada con normativas existentes) procedentes de diversos laboratorios que no tienen un soporte en sus centros (por ejemplo, laboratorios de análisis clínicos). Todas estas consultas se han solucionado, y en caso necesario se les ha aportado el soporte bibliográfico y/o técnico adecuado.

#### *GENERACIÓN DE CONTROL DE CALIDAD EXTERNO DE FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO*

Una de las técnicas diagnósticas que se han desarrollado en los últimos años

ha sido el estudio de fragmentación de ADN espermático. Aunque existen numerosas publicaciones científicas que presentan datos sobre este parámetro de calidad espermática, todavía existe una gran controversia sobre su utilidad clínica y/o diagnóstica; esto puede ser en parte debido a la existencia de diferentes técnicas de análisis y a una falta de controles de calidad de las mismas. Por este motivo, desde el GIA se ha pensado realizar un Control de Calidad Externo para Fragmentación ADN. Para ello, durante este año 2013 ya se han realizado contactos previos con las empresas que tienen test comerciales más utilizados (SCD y TUNEL), se ha diseñado el protocolo (envío de muestras, costes aproximados, posibilidad de realización, etc) y durante el congreso se realizará su presentación para ver la posible aceptación del mismo.

#### *COLABORACIÓN CON OTRAS SOCIEDADES CIENTÍFICAS.*

Otro de los objetivos del Grupo de Interés fue la de colaborar con otras sociedades científicas relacionadas, con el objetivo de incrementar la presencia de la Andrología en distintos ámbitos.

En este sentido, en el año 2011 se celebró una Jornada de "Actualización para la buena práctica clínica y de laboratorio en vasectomía" en Barcelona, co-organizada por 3 sociedades: ASES, SEQC y el GIA de ASEBIR sobre análisis y gestión de los pacientes post-vasectomías. En esta jornada se debatió la problemática generada con el nuevo manual OMS para la determinación de análisis seminales en pacientes vasectomizados, analizando los problemas metodológicos, legales y clínicos para elaborar un resultado fiable en estos pacientes.

Y en el año pasado, en Octubre de 2012, dentro del Congreso Anual de la SEQC se realizó un Curso precongreso

sobre análisis seminal, en el que se invitó a participar a un miembro del GIA hablando sobre "Controversias del análisis seminal: OMS vs ESHRE".

## ÁREA FORMACIÓN

Otro de los objetivos fundamentales del Grupo de Interés es el de realizar cursos de formación de diferentes técnicas de laboratorio o aspectos relacionados con la Andrología.

En este sentido, además de los Cursos de carácter clínico (como los mencionados anteriormente de "Análisis seminal"), se han desarrollado otros Cursos sobre técnicas de laboratorio fundamentales, como la criopreservación, o que están emergiendo con fuerza en estos últimos años, como técnicas de análisis funcional de espermatozoides. Así, se han realizado dos cursos teórico-prácticos, uno en Cáceres y otro precongreso en Sevilla, durante el 2013.

### *I CURSO TEÓRICO-PRÁCTICO DE CONGELACIÓN SEMINAL. GESTIÓN DE UN BANCO DE SEMEN.*

Se realizó los días 07-08 de febrero de 2013, en las instalaciones del Centro de Cirugía Mínima Invasiva Jesús Usón-Aula EMB, en Cáceres. En este curso se desarrollaron las principales técnicas de congelación seminal existentes hasta la fecha, con el fin de afianzar los conocimientos básicos en congelación seminal, tanto para profesionales de la reproducción como para aquellos facultativos que deseaban adquirir conocimientos del tema. Fue un curso teórico-práctico, para un grupo reducido de asistentes, donde las prácticas se combinaron con la asistencia a sesiones teóricas iniciales.

### *CURSO PRE-CONGRESO ASEBIR: CURSO TEÓRICO-PRÁCTICO DE CITOMETRÍA DE FLUJO APLICADA AL ANÁLISIS SEMINAL*

Dentro del Congreso ASEBIR 2013 se realizará un Curso teórico-práctico sobre distintas técnicas de análisis funcional de espermatozoides (fragmentación de ADN espermático, estudio de potencial de membrana mitocondrial, estrés oxidativo intracelular, determinación y aislamiento de espermatozoides

no apoptóticos) cuyo eje común es el análisis mediante citometría de flujo. El objetivo principal del Curso es dar a conocer estas técnicas de laboratorio más específicas que pueden permitir avanzar en el mejor diagnóstico del varón infértil.

## ÁREA DE INVESTIGACIÓN

### *COLABORACIÓN CON LA REVISTA ASEBIR*

El grupo de interés participa desde su generación hasta la actualidad de manera activa como evaluador de los trabajos relacionados con Andrología enviados a la revista ASEBIR para su publicación. Además, ha participado en varias revisiones bibliográficas sobre temas relacionados con Andrología para la revista de ASEBIR a lo largo de 2011 ("Implementación de los nuevos criterios de la OMS en la práctica clínica"), 2012 ("Estado actual del Grupo de Interés de Andrología") y 2013 (en la actualidad se está preparando una revisión sobre "Aislamiento de espermatozoides no apoptóticos mediante selección magnética").

### *PARTICIPACIÓN EN LOS CONGRESOS ASEBIR 2011 Y 2013*

Desde su formación, el GIA ha participado activamente en los dos Congresos nacionales de ASEBIR, Girona 2011 y Sevilla 2013, seleccionando las ponencias dentro de la sesión de Andrología, como en la selección de las comunicaciones al Congreso realizadas por los diferentes centros.

### *COMUNICACIÓN CON LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA*

Uno de los objetivos iniciales del GIA era la de actuar de nexo entre los centros y la industria farmacéutica para la difusión de nuevos fármacos y realización de ensayos clínicos.

En la actualidad están cobrando importancia determinados tratamientos encaminados a mejorar la calidad seminal (tratamientos con antioxidantes, ácidos grasos, etc), pero que necesitan la validación mediante estudios clínicos adecuados. Así, se han puesto en contacto con el GIA algunas

compañías farmacéuticas con el objetivo de dar a conocer estos productos, y al mismo tiempo, ofreciendo la posibilidad de colaboración para la realización de estudios sobre ellos.

### *ACTUALIZACIÓN BIBLIOGRÁFICA EN ANDROLOGÍA*

Al igual que en otros campos, mantenerse actualizado es fundamental para poder mantener un buen nivel técnico y científico. Por ello, desde que se formó el grupo de interés, se tuvo claro que era importante mantener esa actualización; así, se optó por organizar un sistema rotatorio de búsqueda de artículos relevantes en el área, para ponerlos en conocimiento del resto de los integrantes del grupo.

Aprovechando la existencia de este sistema de actualización, se ha propuesto para el año próximo realizar una jornada de "Actualización bibliográfica en Andrología": el objetivo de esta jornada es realizar en un día una actualización bibliográfica de las publicaciones más relevantes del campo de la Andrología en los 5 últimos años.



# Si quieres ahorrar dinero, esto te interesa

## Sea cual sea la fecha de vencimiento de tu póliza de hogar o auto te mejoramos el precio

Solo tienes que traernos la póliza que tengas con cualquier otra compañía antes del 30 de junio de 2013, e independientemente de su fecha de vencimiento, Segurmec te hará una oferta que te garantizará el precio más bajo con las mejores coberturas

### Seguro de automóvil



llama ahora al  
**944 354 600**  
e infórmate  
Teléfono exclusivo para  
Colegiados comercializado  
por Segurmec

Sólo con Segurmec  
**exclusivo para Asociados**  
un precio inmejorable en  
tu seguro de hogar

### Seguro de hogar



llama ahora al  
**94 435 46 00**  
e infórmate  
Teléfono exclusivo para  
Colegiados comercializado  
por Segurmec

Sólo con Segurmec  
un seguro de auto con las  
mejores condiciones  
**exclusivo para Asociados**

### iii Y recuerda!!!

Si ya tienes contratado un seguro de automóvil o un seguro de hogar con nosotros recuerda que estas ofertas son válidas tanto para ti, como Asociado como para tus familiares y allegados.

**Comparte con ellos las ventajas de poder disfrutar de unas condiciones exclusivas**

Y todo esto con nuestro compromiso de seguir ofreciéndote una atención personalizada

Nuestra labor es asesorarte a ti, Asociado y a tus familiares, en todo lo referente al sector de seguros ofreciéndote la mejor póliza para cada necesidad que te surja. Negociamos con compañías aseguradoras de total solvencia para poder ofrecerte coberturas especialmente pensadas para ti, al mejor precio y con las mejores condiciones.

### Siempre pensando en ti

Nuestro equipo de trabajo es un equipo estable formado por un grupo de personas con una larga trayectoria en Segurmec y con una gran experiencia en el sector. Nuestro trato es directo y cercano. Cada vez que te pongas en contacto con nosotros tendrás la seguridad de que nuestro compromiso es mantener contigo una atención personalizada.

**Martín Urrejola Soba** - Director  
**Pedro Gómez Fernández** - Administrativo  
**Amaia Leceta Zarate** - Administrativo  
**Marisa Marín de Vega** - Administrativo  
**Maialen Ruiz de Oña Ibañez** - Administrativo  
**Luis Mari Clemente Ormaeche** - Comercial  
**Ricardo Vallejo Martínez** - Comercial

### Contacta

Por teléfono: 944354600

Por fax: 944354702

Por correo electrónico: [segurmec@colegiomedicosbizkaia.com](mailto:segurmec@colegiomedicosbizkaia.com)



## NUEVOS MÉTODOS DE SELECCIÓN ESPERMÁTICA: ¿POR QUÉ, CUÁNDO, CÓMO Y PARA QUIÉN?

Juan G. Alvarez, M.D., Ph.D.

Centro ANDROGEN, La Coruña. Harvard Medical School, Boston.

Recientemente se han introducido nuevos métodos de selección espermática en el laboratorio de in vitro con el objetivo de mejorar la calidad morfológica y genómica de los espermatozoides utilizados en técnicas de reproducción asistida. Algunos de estos métodos incluyen las columnas de afinidad de células del cúmulo, la microfluídica, la recuperación de espermatozoides unidos a la zona pelúcida, la unión al ácido hialurónico, las columnas de Annexin-V, intracytoplasmic morphologically-selected sperm injection (IMSI), la birrenfringencia, el potencial zeta y la electroforesis.

Esta presentación se va a centrar en los nuevos métodos de selección espermática que más se utilizan hoy en día y que al mismo tiempo son objeto de debate. Estos métodos son: la unión al ácido hialurónico (PICSI®, SpermSlow™), IMSI y las columnas de Annexin-V.

Si bien se ha reportado que la presencia de receptores de ácido hialurónico en la membrana espermática se considera un signo de madurez espermática y que los espermatozoides que se unen al ácido hialurónico tienen una mejor calidad morfológica y genómica (Prinosilova et al., *Reprod Biomed Online*, 2009; Jakab et al., *Fertil Steril*, 2005; Yaqci et al. *J Androl*, 2010), los resultados obtenidos mediante el uso de PICSI o SpermSlow en FIV convencional o en ICSI son similares a los obtenidos cuando se utilizan métodos estándar de selección espermática como el swim-up o los gradientes de densidad (Said et al., *Hum Reprod Update*, 2011).

En relación a la técnica de IMSI, estudios randomizados indican que este método de selección espermática, basado principalmente en la visualización de vacuolas nucleares a alta magnificación, no ofrece ventajas significativas comparado con la técnica estándar de ICSI en lo que se refiere a tasas de fecundación, desarrollo embrionario o tasas de embarazo en técnicas de reproducción asistida (De Vos et al., *Hum Reprod*, 2013).

Finalmente, se evaluará la eficacia y seguridad de las columnas de Annexin-V. El principio en el que se basan estas columnas es que los espermatozoides apoptóticos expresan fosfatidilserina en la hemicapa externa de la membrana y que la fosfatidilserina se une a la Annexin-V. Este principio se ha aplicado al desarrollo de las llamadas columnas de Annexin-V en las que primero, espermatozoides seleccionados mediante swim-up o gradiente de densidad se incuban con unas microesferas de metal recubiertas de un polímero biodegradable conjugadas con Annexin-V y luego se pasan por una columna expuesta a un campo magnético. Los espermatozoides que expresan fosfatidilserina se unen a las microesferas conjugadas con Annexin-V y quedan retenidos en la columna por acción del campo magnético, mientras que los que no expresan fosfatidilserina no se unen a las microesferas y pasan libremente a través de la columna sin ser retenidos y son los que se van a utilizar en técnicas de reproducción asistida. De ahí que a esta técnica se la conozca también como MACS (Magnetic-Activated Cell

Sorting). Los espermatozoides que expresan el marcador apoptótico, fosfatidilserina, provienen de células germinales genómicamente defectuosas que habían sido marcadas durante el proceso de espermatogénesis para ser eliminadas por la célula de Sertoli pero que escaparon este proceso de eliminación y aparecen en el eyaculado. Ello explica por qué los espermatozoides que no expresan fosfatidilserina en la hemicapa externa, seleccionados mediante las columnas de Annexin-V tienen unas tasas de aneuploidia y de daño de DNA más bajas que los que quedan retenidos en la columna. Si bien la eficacia y seguridad de las columnas de Annexin-V/MACS deberían de ser confirmadas en estudios randomizados, un meta-análisis reciente demuestra que las tasas de embarazo en técnicas de reproducción asistida fueron más altas cuando se utilizaron espermatozoides seleccionados mediante las columnas de Annexin-V/MACS que cuando se utilizaron espermatozoides seleccionados mediante swim-up o gradiente de densidad (Gil et al., *J Assist Reprod Genet*, 2013). Dado el valor predictivo positivo y negativo tan bajo que tienen los tests de fragmentación del DNA espermático actualmente disponibles, no se recomienda utilizar un DNA Fragmentation Index (DFI) anormal como indicación para el uso de las columnas de Annexin-V/MACS. Únicamente se recomienda su uso basado en indicaciones clínicas tales como fallo de implantación y aborto recurrente idiopático.

## THE MEANING OF SPERMATIC VACUOLES AND ART RELATIONSHIPS

Giovanni Ruvolo<sup>o</sup>, Dorian Falagario<sup>§</sup>, Raffaella De Palo<sup>§</sup>, Ettore Cittadini<sup>o</sup>

<sup>o</sup> Centro di Biologia della Riproduzione, Via Valerio Villareale 54, 90141 Palermo, Italy

<sup>§</sup> Unit of Physiopathology of Human Reproduction and Gametes Cryopreservation, Department of Gynecology, Obstetric and Neonatology, University of Bari "Aldo Moro", Bari, Italy

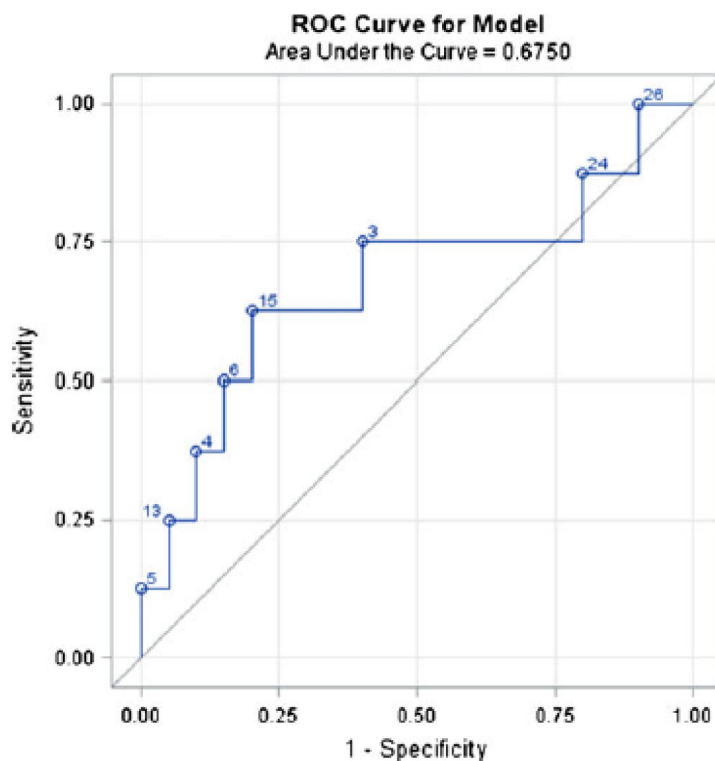
[ruvologi@hotmail.com](mailto:ruvologi@hotmail.com)

### INTRODUCTION, MATERIALS, METHODS

In recent years, increased interest to better understand the concept of "sperm competence" has provided new knowledge about the relationship between the quality of the sperm and clinical outcome in terms of pregnancy and implantation rate, this has lead many researchers to investigate new methods for the selection of sperm in IVF/ICSI treatments. Sperm morphology seems to be a potential marker of sperm competence, helping, also, in the case of the single sperm morphological analysis to give interesting information about the intrinsic quality of sperm, in particular

when ICSI is performed. In the last decade MSOME selection method together with IMSI has been gradually introduced as an alternative to conventional ICSI. For IMSI sperm selection, the main parameters to be analyzed were the shape and size of the nucleus (length and width) and the presence/absence of vacuoles. More recently, the analysis of the presence of vacuoles has gained particular prominence with respect to the outcomes of assisted reproductive technology (ART). The origin of these vacuoles as well as their effect on embryo development and implantation remains unclear, but it is possible to hypothesis a relationship between sperm head morphology

and chromatin quality. The aim of the present study was to investigate the relationship between sperm nuclear vacuoles and sperm morphology and DNA fragmentation in semen sample from patient undergoing ICSI cycles and to understand the influence of the rate of spermatozoa with head vacuolization in a seminal sample (SVR) on the clinical outcomes, evaluating pregnancy rate, fertilization rate, implantation rate and embryo quality. The study was conducted on a total of 26 patients underwent ICSI (average age was  $38,52 \pm 5,1$  years). For high magnification analysis 0,1 ml aliquot of prepared sample was smeared on a glass slide, air-dried at room temperature, rehydrated in HEPES-buffed medium (G-MOPS, Vitrolife, Sweden) and covered with a glass slide and observed using x100 objective with immersion oil. DNA fragmentation has been performed, on 7 of the 26 patients using TUNEL assay



**Fig. 1 ROC Curve.** ROC Curve analysis for the percentage of sperm vacuolization using 100 x magnification as a prognostic factor regarding clinical pregnancy after ICSI. The area under the curve is 0,675. The best discriminating percentage is 20,28 %

### RESULTS

In the 26 seminal samples studied, we found that the average SVR was  $24,83 \pm 7,08$  and the percentage of abnormal spermatozoa with nuclear vacuoles was  $(22,07 \pm 8,58)$ , significantly higher ( $p < 0,001$ ) than the percentage of normal spermatozoa with nuclear vacuoles ( $2,2 \pm 1,82$ ). Using the ROC curve, SVR shows the best discriminatory performance to distinguish patients who obtained pregnancy between the others that is 20.28 (Fig. 1). SVR was significantly lower in patients achieving pregnancy after ICSI cycle (Tab.1). No relationship was found between SVR and DNA fragmentation index (DFI) for each sample analyzed, and for each spermatozoa showing large vacuole in the head (Tab. 2).

### DISCUSSION

Evaluation of SVR could be an additional semen evaluation to select patients for IMSI. A SVR less than 20.28% is associated

to higher pregnancy and implantation rate after ICSI cycle. Vacuolization is an evidence of sperm nuclear alteration but it is not associated to DNA fragmentation. More studies are needed to understand the role of the vacuoles on paternal effect on embryo development.

## REFERENCES

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Crippa A, Lappi M, Capitani S, Baccetti B. Birefringence characteristics in sperm heads allow for the selection of reacted spermatozoa for

intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2010;93(3):807-813.

Greco E, Scarselli F, Fabozzi G, Colasante A, Zavaglia D, Alviggi E, Litwicka K, Varricchio MT, Minasi MG, Tesarik J. Sperm vacuoles negatively affect outcomes in intracytoplasmic morphologically selected sperm injection in terms of pregnancy, implantation, and live-birth rates. *Fertil Steril.* 2013;100(2):379-385.

Vanderzwalmet P, Hiemer A, Rubner P, Bach M, Neyer A, Stecher A, Uher P, Zint M, Lejeune B, Vanderzwalmet S, et al. Blastocyst

development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reprod Biomed Online.* 2008;17:617-627.

El Khattabi L, Dupont C, Sermondade N, Hugues JN, Poncelet C, Porcher R,

Cedrin-Durnerin I, Levy R, Sifer C. Is intracytoplasmic morphologically selected sperm injection effective in patients with infertility related to teratozoospermia or repeated implantation failure? *Fertil Steril.* 2013;100(1):62-68.

	Group A (SVR ≤ 20,28) means ± s.d. (total)	Group B (SVR > 20,28) means ± s.d. (total)	P value
Patient number	7	19	
Male age (y)	36,71 ± 6,18	39 ± 4,67	n.s.
Female age (y)	34,14 ± 3,68	37,17 ± 5,32	n.s.
Total sperm count (10 <sup>6</sup> /mL)	43 ± 21,17	27,64 ± 18,41	n.s.
Morphology: normal forms (%)	30,71 ± 10,18	28,16 ± 14,83	n.s.
Motility: rapid + slow progression (%)	52,86 ± 17,99	50,79 ± 22,69	n.s.
Sperm nuclear vacuoles rate (%)	17,21 ± 1,74	27,67 ± 6,13	<0,001
Abnormal spermatozoa with nuclear vacuoles (%)	14,59 ± 2,33	24,83 ± 8,4	<0,05
Normal spermatozoa with nuclear vacuoles (%)	2,62 ± 1,23	2,04 ± 2	n.s.
N° of MII oocytes injected	5,43 ± 2,07	4,26 ± 2,33	n.s.
N° of zygotes	4,43 ± 1,9	3,11 ± 1,79	n.s.
Fertilization rate (%)	86 ± 21,91	75,76 ± 21,76	n.s.
N° of top embryos	4,14 ± 1,77	3,05 ± 1,78	n.s.
N° of embryos transferred	2,29 ± 0,95	2,37 ± 0,96	n.s.
Pregnancy rate (%)	57,14	15,79	<0,05
Implantation rate (%)	35,7	7,7	<0,001

Tab. 1: Clinical outcomes in patients showing an SVR ≤ 20.28 (group A) or > 20.28 (group B)

Patient	Vacuolized sperm in seminal sample (%)	Positive Tunel test in seminal sample (%)	Vacuolized sperm/normal morphology (%)	Vacuolized sperm/ altered morphology (%)	Positive Tunel in vacuolized sperm (%)
1	40,91 (a)	6,57	19,23	21,68 (b)	7.9
2	29,14 (a)	9,27	12,91	16,22 (b)	8.3
3	62,3 (a)	14,01	16,75	45,55 (b)	12.6
4	55,37 (a)	17,86	14,46	40,91 (b)	13.2
5	45,93 (a)	23,57	25,36	20,57 (b)	9.2
6	51,94 (a)	24,3	18,45	33,49 (b)	10,68
7	40 (a)	32,34	8,84	31,16 (b)	6.7

Tab. 2: Comparison between DFI, SVR and single sperm analysis of vacuolization and DNA fragmentation in 7 patients



## ESTADO ACTUAL DEL GRUPO DE INTERÉS DE EMBRIOLOGÍA

M<sup>a</sup> José de los Santos, Raquel Herrer, Luz Rodriguez, Jorge Ten, Agueda Ortiz, Jorge Cuadros, M<sup>a</sup> José Figueroa, Gemma Arroyo, Marta Moragas, Miguel Ángel Vilches, Ana Busquets, M<sup>a</sup> Carmen Pons, Victoria Hurtado de Mendoza  
[MaríaJose.DelosSantos@ivi.es](mailto:MaríaJose.DelosSantos@ivi.es)

Hola a todos, parece mentira pero ya han transcurrido dos años desde nuestro encuentro en Girona y la verdad, han sido unos años muy intensos, pero hemos intentado cumplir con los objetivos y actividades que os planteamos durante el congreso.

Para los nuevos socios os contamos que nuestro Grupo de Interés de Embriología (GIE) se constituyó como tal tras la finalización de una comisión de trabajo sobre evaluación de la calidad embrionaria que encargó la Junta Directiva de ASEBIR en el año 2007.

Actualmente, entre sus objetivos principales del grupo figuran:

- Difusión de los cuadernos
- Relación con otras sociedades (Alpha y ESHRE)
- Publicación de los criterios de clasificación propuestos
- Aplicación de la clasificación y su revisión
- Ampliación de la clasificación a nuevos criterios (división temprana y observación del ovocito con luz polarizada)
- Organización de actividades formativas (cursos)

Ya en el 2011 os informamos de actividades más específicas así como de inquietudes que nos surgieron y a las que queríamos dar respuesta.

Entre esos objetivos figuraban la necesidad de actualización los criterios de ASEBIR para algunos fenotipos embrionarios en día 2 y en día 3 de desarrollo, publicar una nueva clasificación de blastocitos, ya que la que aparecía en el cuaderno quedaba incompleta, publicar los resultados del estudio multicéntrico sobre división temprana y validar la nueva clasificación de blastocitos mediante una nueva recogida de datos cuya invitación a participar ya recibisteis a través de nuestra secretaría técnica. Todo ello

acompañado por una labor docente que no debemos perder.

Pues bien el estado actual de todos estos objetivos es el siguiente:

- 1. Formación:** Este apartado de objetivos se tradujo en la elaboración y realización de un curso titulado "Uso práctico de la clasificación de ASEBIR de embriones en D+2, D+3, D+5 y D+6" que tuvo lugar en Alicante en Mayo de 2012, de la mano de Dr. Jorge Ten y que fue amablemente patrocinado por Cook.
- 2. Revisión de la catalogación de ASEBIR para embriones en día 2 y en día 3 de desarrollo:** Se revisó la implantación de un total de 3080 embriones para su reclasificación en los diferentes grupos en función de su implantación.
- 3. Publicación de una nueva clasificación de blastocitos:** En esta publicación se añadió también información sobre embriones en D+4 y se puede consultar en la página web de ASEBIR. Las doctoras Marta Moragas y Ana Busquets hicieron un magnífico trabajo.
- 4. Publicación en revista de ámbito internacional de los resultados sobre la división temprana:** El trabajo ha sido enviado a la revista de Fertility and Sterility, en este momento estamos trabajando en la segunda revisión del manuscrito. En este tema la participación las doctoras M<sup>a</sup> Jose Figueroa y Gemma Arroyo ha sido fundamental.
- 5. Validación de la catalogación ASEBIR de blastocitos:** En este momento estamos en la fase de recogida de datos y el Dr. Miguel Angel Vilches será el coordinador.
- 6. Actualización del Cuaderno de Embriología "Criterios de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones tempranos y Blastocitos Humanos":** El grupo de interés considera que llegado el momento de actualizar el cuaderno.

Actualmente tenemos revisados la mayor parte de los capítulos, este trabajo esta coordinado por la Dra. Victoria Hurtado de Mendoza y es muy posible que los datos de catalogación de ASEBIR vengan apoyado con datos no sólo de implantación sino de RNV gracias a la labor magnífica de la Dra. M<sup>a</sup> Carmen Pons que se encargó de la recogida de datos, y al resto de componentes del GIE que han colaborado en la aportación de datos para tal fin.

Por supuesto hay muchas cosas que hacer, sin ir más lejos dedicarnos al tema de time-lapse, etc... pero eso será para los próximos años.

No me gustaría acabar sin despedirme del grupo, tocan elecciones y es hora de pasar al "backstage", ha sido una experiencia muy positiva, gracias a todos los componentes del grupo por su disponibilidad, y animo encarecidamente a los socios de ASEBIR a participar y a formar parte del GIE.



## COMBINACIÓN DE MORFOLOGÍA Y MORFOCINÉTICA POR "TIME-LAPSE"

Y. Motato, I. Rubio, M. Meseguer.  
 Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) Valencia  
[Marcos.Meseguer@ivi.es](mailto:Marcos.Meseguer@ivi.es)

### INTRODUCCIÓN

Las técnicas de Fecundación in Vitro (FIV) han sido ampliamente utilizadas en las últimas décadas para el tratamiento de la infertilidad tanto masculina como femenina y aunque desde el nacimiento de la primera niña concebida por FIV en 1978, el número de nacidos vivos se ha incrementado, por ejemplo en Europa representa hoy en día entre 2-4% de los nacimientos anuales, este porcentaje permanece relativamente bajo debido en gran medida a los fallos de implantación, ya que sólo dos de cada diez embriones lo logran (Seli E, et al., 2010) así mismo, la incidencia de nacimientos gemelares en estas parejas es alta comparado con la población general. Un ejemplo es el Reino Unido donde ésta alcanza el 10% para el año 2012 con las subsecuentes complicaciones clínicas tanto para la madre como para el recién nacido.

Por tanto, uno de los principales objetivos actualmente en los laboratorios de FIV consiste en realizar la transferencia de solo un embrión, estrategia conocida como *eSET* (elective Single Embryo Transfer), sin que ésta afecte negativamente las tasas generales de gestación.

Sin embargo, en la mayoría de los centros de Reproducción Humana Asistida la selección embrionaria se realiza teniendo en cuenta sólo los criterios morfológicos evaluados a través del microscopio (Montag M, et al., 2011) con las grandes limitantes que ésta lleva implícita por una parte, la subjetividad puesto que depende directamente de la apreciación del embriólogo y por otra, el momento exacto en el que se lleva a cabo percibiéndose el desarrollo embrionario desde un punto de vista estático.

### LA MORFOLOGÍA EMBRIONARIA EN LOS TRATAMIENTOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

La clasificación morfológica de los gametos y embriones ha sido empleada desde el comienzo de la FIV hasta la actualidad para definir el desarrollo embrionario (Edwards R.G, et al., 1981) y ha sido utilizada como herramienta para seleccionar el mejor embrión a transferir (Hill G.A, et al., 1989; Alpha 2011).

Aunque esta evaluación sirve como indicador general de la calidad en la mayoría de los laboratorios de reproducción asistida, no ha sido capaz de identificar el embrión con mayor competencia dentro de una cohorte además la utilización de los diferentes sistemas de clasificación embrionaria por parte de los diferentes centros dificulta la definición de las características con las que debe contar el embrión a transferir. Por tal motivo se hace necesario la estandarización y validación de conceptos relacionados con la morfología del embrión, que a su vez facilitará la evaluación de los resultados de estas técnicas de una manera más eficiente. Es así, como en algunos países se han creado consensos nacionales como la Asociación de Embriólogos Clínicos (ACE) y la Sociedad Británica de Fertilidad (BFS) en el Reino Unido, así como la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR).

Ya que la morfología del embrión es actualmente el factor más importante para la predicción de la gestación, ASEBIR ha definido un sistema dinámico en el que se incluyen todas las etapas del desarrollo embrionario desde el gameto hasta el estadio de blastocisto. Este modelo ha sido evaluado en un ensayo multicéntrico en los laboratorios de FIV en España, que incluye 15 ciclos y fue presentado en el taller realizado en Estambul (Turquía) en el año 2010.

### EVALUACIÓN OVOCITARIA

Los factores que se incluyen en la evaluación de la calidad de los ovocitos son: los dismorfismos citoplasmáticos ovocitarios, los dismorfismos extracitoplasmáticos y el complejo ovocito-corona-cumulus. En el que se concluyó que las anomalías extracitoplasmáticas son simplemente desviaciones fenotípicas.

### EVALUACIÓN DEL CIGOTO

Los parámetros morfológicos para la evaluación del cigoto son: la polarización, la presencia de un halo citoplasmático, el número de pronúcleos y la aparición pronuclear. Se acordó que, dado que las características morfológicas están relacionadas con el tiempo después de la fecundación, la evaluación del cigoto debe realizarse dentro de un período de tiempo concreto después de la inseminación. Si el cigoto presenta un cuerpo polar y dos pronúcleos, debe descartarse, mientras que si presenta dos cuerpos polares pero un solo pronúcleo, es decisión del laboratorio si continúa o no con la evaluación de su desarrollo in vitro.

### EVALUACIÓN DE LOS EMBRIONES EN DIVISIÓN

Concluyó que los embriones se clasificarán en cuatro categorías:

A= máxima calidad  
 B = buena calidad (aunque no para la transferencia electiva de un solo embrión *eSET*)  
 C = mala calidad embrionaria  
 D= no recomendado para transferir (incluye todos los embriones multinucleados).  
 En esta evaluación se deben tener en cuenta tanto el medio de cultivo como el sistema empleado para el mismo ya que se reconoce que tienen un

impacto significativo en la morfología embrionaria. Por tanto, se recomienda que cada laboratorio desarrolle sus propias descripciones embrionarias en cada una de estas categorías, con base en las observaciones existentes.

## EVALUACIÓN DEL BLASTOCISTO

Los embriones deberán ser evaluados en el Día 4 de desarrollo para determinar la presencia o no de compactación, ya que se considera un buen pronóstico de llegada a blastocisto mientras que el desarrollo diferido hasta días 7 u 8 se consideran un mal pronóstico para la implantación.

## NUEVAS TÉCNICAS PARA LA EVALUACIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO

Con la finalidad de obtener una información más completa y detallada del embrión a transferir se han desarrollado dos líneas grandes de estudio, por una parte se encuentran los procedimientos invasivos entre ellos el análisis genético pre-implantacional (DGP) y por otra los no invasivos en los que recientemente se ha centrado la atención ya que conservan la integridad del embrión. Un ejemplo de éstos es la metabolómica en la que se determinan los productos generados a partir de su metabolismo en el medio de cultivo. Aunque éstas han sido motivo de algunas investigaciones actualmente no se encuentran disponibles para el uso clínico rutinario.

La estrategia más reciente dentro de este grupo de técnicas no invasivas es la evaluación de los cambios morfológicos en el tiempo, conocida como análisis morfocinético. Se realiza a través del sistema de time-lapse o captura consecutiva de imágenes en el cual, siguiendo el curso del desarrollo embrionario desde del momento de la micro inyección hasta el estadio de blastocisto, se evalúan de una forma detallada los eventos asociados a la calidad embrionaria y a la implantación sin someterlos a cambios de temperatura y pH así como a exposiciones prolongadas de luz, que pueden ejercer un efecto adverso en su desarrollo y calidad.

A través de esta tecnología se han podido observar novedosos fenómenos entre los que se encuentra la reabsorción de los fragmentos, principalmente en embriones con citocinesis normal y grados de fragmentación moderada y alteraciones en los patrones de división es decir, aquellas que no llegan a completarse tras varios intentos (Wong CC, et al., 2010) ha permitido determinar con exactitud la duración de los primeros ciclos celulares, el tiempo entre dos divisiones celulares consecutivas y la presencia o no de división directa, definida como aquella división abrupta de 2 a 3 células en menos de 5 horas y que ha sido posible correlacionar con embriones que presentan tasas de implantación bajas, alrededor de 3% (Rubio et al., 2012). Así mismo ha permitido evaluar la primera división celular y determinar con exactitud la simetría entre las blastómeras (Lemmen J et al., 2008), entre otros.

Por otra parte, la tecnología del time-lapse además de suministrar información exacta sobre el desarrollo de los embriones y evaluarlo desde un punto de vista dinámico, es considerada una herramienta segura en los laboratorios de fecundación in vitro, debido principalmente a que no ejerce un efecto negativo en los embriones (Meseguer M, et al., 2012; Cruz M, et al., 2011; Kirkegaard K, et al., 2012; Nakahara T, et al., 2010).

Algunas investigaciones realizadas han propuesto determinar a través del uso del time-lapse marcadores cinéticos en embriones humanos (**Tabla 1**) que puedan asociarse con su viabilidad, entre ellos se encuentra el tiempo de las divisiones celulares (Ciray HN, et al., 2006; Lemmen JC, et al., 2008; Mio Y, et al., 2008) y también se han analizado los posibles efectos de factores tanto intrínsecos como extrínsecos en el comportamiento morfocinético del embrión (Ciray HN, et al., 2012; Muñoz M, et al., 2012; Bellver J, et al., 2013).

## EVALUACIÓN DE PARÁMETROS MORFOCINÉTICOS POR TIME LAPSE

Con base en las asociaciones entre los parámetros morfocinéticos

característicos del desarrollo embrionario temprano y la implantación, Meseguer y colaboradores (Meseguer M, et al., 2011) realizaron un análisis de 247 embriones transferidos con implantación conocida a partir de la cual han desarrollado un modelo de clasificación y selección jerárquica.

En este modelo se identifican 6 categorías embrionarias (**A a F**), a su vez cuatro de ellas se subdividen en otras dos (+) o (-) dando así un total de 10 categorías. Este modelo tiene como punto de partida la evaluación morfológica de todos los embriones de la cohorte con el objetivo de identificar los embriones que evidentemente no son viables (bloqueados o altamente anormales) considerados no aptos para la transferencia y clasificados como de categoría **F**. Posteriormente excluyeron los embriones que presentaron: asimetría en el tamaño de las blastómeras en el estadio de 2 células, división directa o multinucleación en el estadio de 4 células, y forman parte de la categoría **E**. Finalmente en los embriones viables se analizan las siguientes variables: el tiempo de división a 2 células (**t2**), a 3 (**t3**), 4 (**t4**) y a 5 células (**t5**), la duración de la transición de un embrión de 2 células a 4 (**s2=t4-t3**) y la duración del segundo ciclo celular (**cc2=t3-t2**).

Posteriormente calcularon el porcentaje de embriones que implantaron para cada cuartil de tiempo con el objetivo de evaluar la distribución de la implantación en las diferentes categorías. Esta clasificación definida por esos cuartiles fue usada para establecer rangos óptimos basados en dos cuartiles consecutivos con altas probabilidades de implantación.

Para describir la distribución de las probabilidades de implantar, los tiempos de las divisiones celulares son convertidos de variables continuas a variables categóricas dividiéndolas en grupos en función de sus cuartiles. Utilizando el análisis de regresión logística se identificó a **t5**, seguido por **s2** y **cc2** como las variables que con mayor probabilidad pueden caracterizar los embriones que implantan.

Estudio	Objetivo	Tamaño muestral	Sistema de time-lapse (TMS)
Hlink et al. (2008)	Análisis de la cronología de eventos mitóticos tempranos	180 emb, 114 blastos de buena morfología	Primo Vision (Cryo Innovations, Hungary)
Lemmen et al. (2008)	Identificación de marcadores ligados a calidad embrionaria e implantación	102 emb correctamente fecundados. 29 emb transferidos	Nikon Diapot 300 con cámara incorporada
Mio et al. (2008)	Análisis de cambios en el desarrollo de embriones en estadios tempranos	46 embriones transferidos	Microscopio invertido (IX-71; Olympus, Japan) y microinyector rodeado de una cámara de resina acrílica.
Wong et al. (2010)	Potencial de los embriones de llegar a blastocisto utilizando 3 parámetros dinámicos	100 embriones	Olympus iX-70/1 con apertura para iluminación con campo oscuro
Nakahara et al. (2010)	Evaluar la seguridad del time-lapse utilizando un incubador con microscopio incorporado	84 ovocitos TMS, 84 incubador convencional (IC)	SANYO In vitro Live Cell Imaging Incubation System (MCOK-5; Sanyo Co., Ltd., Japón)
Cruz et al. (2011)	Demostrar que las condiciones de time-lapse son comparables a las de un incubador convencional	Embriones viables: 68TMS; 84 IC	Embryoscope™ (Unisense Fertiltech, Denmark)
Meseguer et al. (2011)	Generar y evaluar una herramienta de selección embrionaria basada en parámetros morfocinéticos	247 embriones transferidos	Embryoscope™ (Unisense Fertiltech, Denmark)
Rubio et al. (2012)	Analizar tasas de implantación de embriones con divisiones de 2 a 3 células en menos de 5h	1659 embriones transferidos	Embryoscope™ (Unisense Fertiltech, Denmark)
Kirkegaard et al. (2012)	Comparación del incubador convencional y un incubador con time-lapse	297 ovocitos TMS; 303 ovocitos IC	Embryoscope™ (Unisense Fertiltech, Denmark)
Hashimoto et al. (2012)	Evaluar el desarrollo cinético de embriones y su capacidad de llegar a blastocisto	80 cigotos desvitrificados	Biostation CT(Nikon)
Chavez et al. (2012)	Analizar la cronología de eventos mitóticos en embriones de 4 células	75 cigotos, 53 embriones	Microscopio invertido con iluminación LED modificada para campo oscuro
Dal Canto et al. (2012)	Analizar tiempos de divisiones hasta 8 células y relacionarlos con capacidad de llegada a blastocisto y con implantación	459 cigotos	Embryoscope™ (Unisense Fertiltech, Denmark)
Cruz et al. (2012)	Analizar asociaciones entre divisiones cinéticas y capacidad de llegada a blastocisto	834 embriones	Embryoscope™ (Unisense Fertiltech, Denmark),
Meseguer et al. (2012)	Comparar tasas de gestación en incubador convencional frente a time-lapse	Embriones transferidos: 1390 TMS; 5915 IC	Embryoscope™ (Unisense Fertiltech, Denmark)
Basile et al. (2013)	Evaluar los efectos de dos medios de cultivo diferentes en marcadores de calidad embrionaria.	223 MII: 369 en Global y 354 cultivados en Cleavage.	Embryoscope™ (Unisense Fertiltech, Denmark)

**Tabla 1:** Estudios con Time Lapse para evaluar marcadores cinéticos en embriones humanos

## Clasificación Morfocinética por Time-Lapse

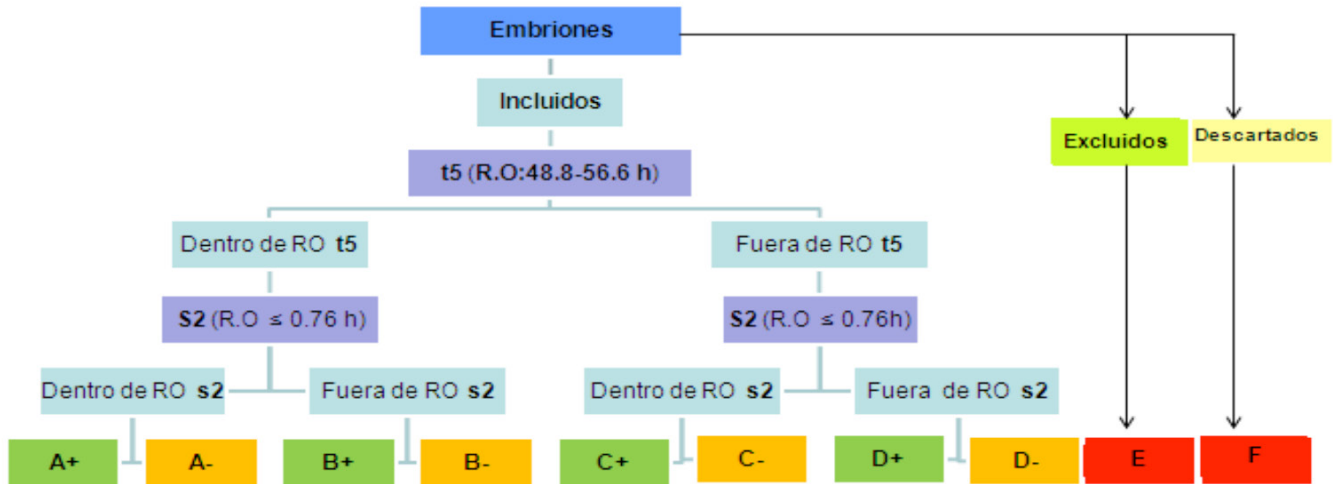


Figura 1 Modelo de Clasificación morfocinética

Por último, la clasificación del embrión se realiza con base en: si el tiempo de división a 5 células se encuentra dentro del rango óptimo (R.O: 48.8-56.6h) el embrión es clasificado como categoría **A** o **B** y si éste se encuentra fuera o si no es observada a las 64 horas post ICSI será **C** o **D**. Así mismo si los valores para s2 se encuentran dentro del rango óptimo (R.O: < 0.76h) el embrión será categorizado como **A** o **C** teniendo en cuenta t5 o como **B** o **D** si se encuentra fuera del rango óptimo. Por último, con base en el tiempo para cc2, el embrión se categoriza con una puntuación extra o plus, si este valor se encuentra dentro del rango óptimo (R.O: ≤ 11.9h) tendremos **A+**, **B+**, **C+** y **D+** pero si el valor se encuentra fuera será **A-**, **B-**, **C-** y **D-** (Figura 1).

### EVALUACIÓN MORFOLÓGICA Y MORFOCINÉTICA DE EMBRIONES.

Con el objetivo de evaluar los resultados de implantación obtenidos a partir de dos sistemas diferentes de clasificación embrionaria, el morfológico incluyendo la división temprana y el morfocinético, se analizaron los embriones transferidos con implantación conocida que han sido obtenidos de 946 primeros ciclos de ICSI realizados en el Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI). Del total de embriones estudiados 432 presentaron un 100% de implantación es decir, el número de sacos gestacionales coincide con el número de embriones transferidos representando el 28,4% y 1089 embriones no la presentaron. Por consiguiente, para este análisis no se pudieron evaluar las transferencias con

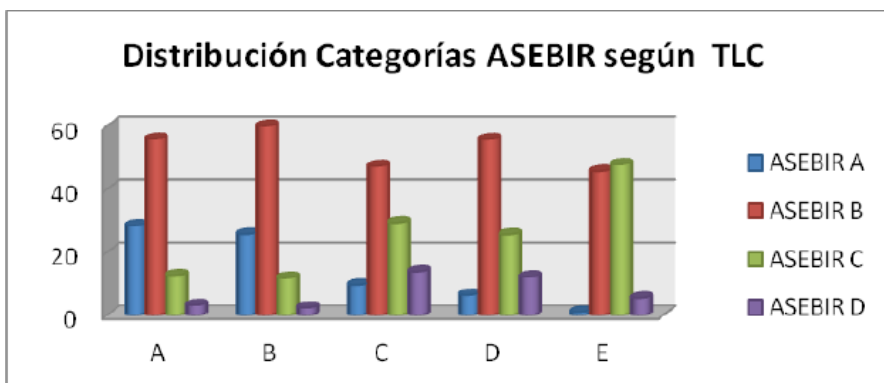
más de un embrión donde sólo alguno de ellos implantó.

Los embriones transferidos fueron seleccionados de acuerdo a criterios morfocinéticos o Time-Lapse Categorization (TLC) en 5 categorías desde la A hasta la E utilizando el Embryoscope™ (Fertilitech, Dinamarca) como sistema de vigilancia y según ASEBIR se clasificaron en A, B, C o D.

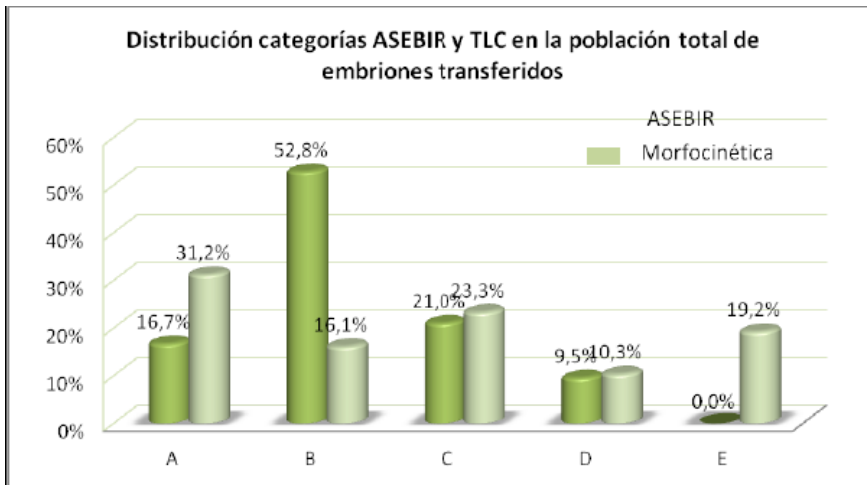
Además de las tasas de implantación se analizaron las coincidencias en la categorización entre ambos modelos.

### DISTRIBUCIÓN DE LOS EMBRIONES EN FUNCIÓN DE LA CATEGORÍA

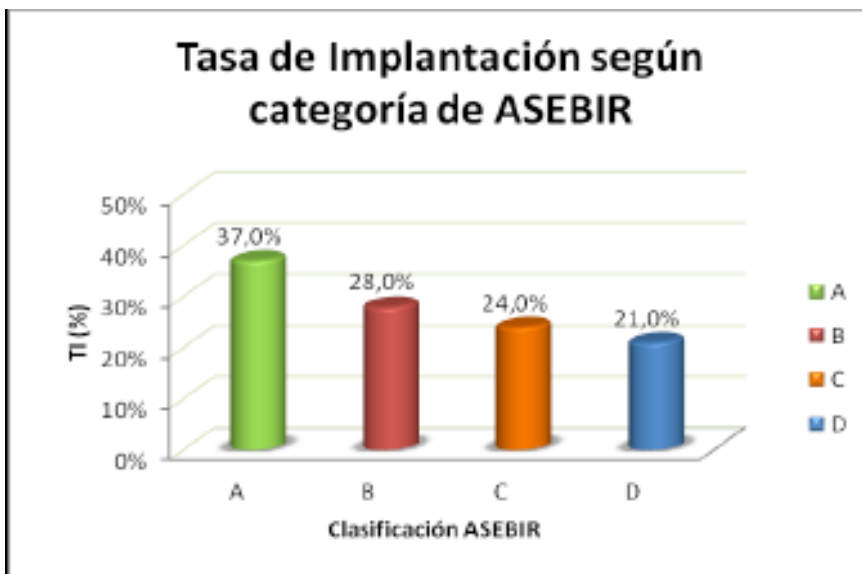
Una vez clasificados los embriones a transferir de acuerdo a sus tiempos de división, se analiza las frecuencias de cada clase morfológica comparándolas entre sí es decir, evaluamos las proporciones de cada categoría morfológica dentro de cada categoría TLC (Gráfica 1). En la cual, se observa una distribución heterogénea en las diferentes categorías según ASEBIR, aunque se observa cierta relación entre ellas, ya que las categorías de peor pronóstico según TLC presentan un incremento en la proporción de embriones con peor morfología. En consecuencia, TLC y ASEBIR están intrínsecamente relacionados.



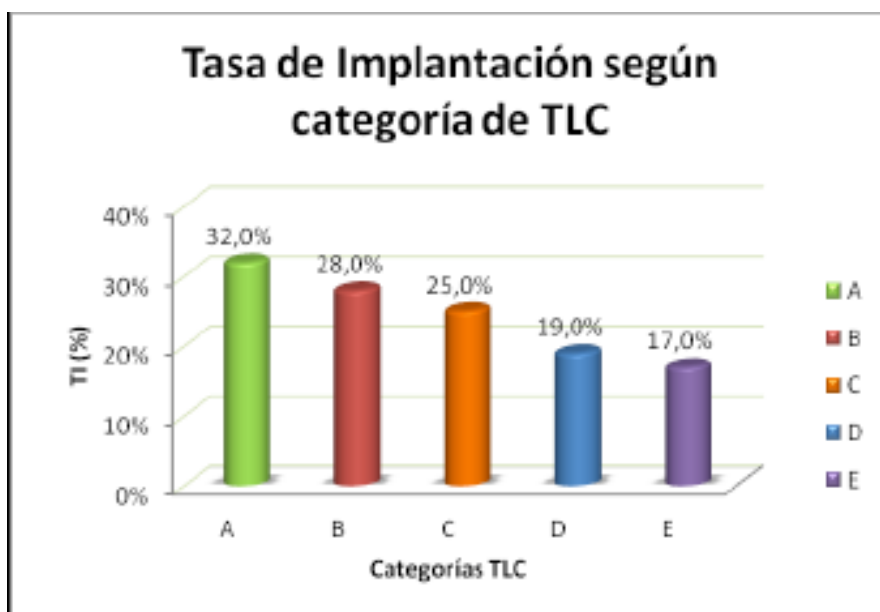
Gráfica 1. Distribución de categorías ASEBIR dentro de cada categoría TLC



Gráfica 2. Distribución de las proporciones que cada categoría según ASEBIR y TLC representa en la población total de embriones transferidos.



Gráfica 3. Distribución de las Tasas de Implantación (TI) según categorías ASEBIR



Gráfica 4. Distribución de las Tasas de Implantación (TI) según categorías de TLC

Por otro lado y analizando las proporciones de cada sistema de clasificación embrionaria por separado, observamos que según ASEBIR se distribuyen principalmente en la categoría B (52,8%) mientras que en el TLC la distribución es homogénea, siendo para la categoría A: 31,3%, B: 16,1%, C:23,3%, D:10,3% y E:19,0% (Gráfica 2).

Por tanto, embriones que no cumplen estrictamente con los criterios morfológicos pueden presentar tiempos adecuados de división según el TLC como ocurre con los embriones clasificados como B según ASEBIR pero categoría A según su morfocinética o por el contrario, pertenecer a categorías que no cumplen con los tiempo adecuados de división (C, D y E).

Es importante resaltar que aunque la mayoría de los embriones catalogados como B coinciden en los dos sistemas de clasificación, sólo con el modelo de TLC es posible identificarlos como A o B con las diferencias en la probabilidad de implantación que implica.

### CÁLCULO DE LA TASA DE IMPLANTACIÓN EN FUNCIÓN DE LA CATEGORIZACIÓN

Una vez clasificados los embriones de acuerdo a sus características se comparan los resultados de ambos modelos en términos de sus tasas de implantación (TI) en la que se observa que el 83,9% de los embriones clasificados por ASEBIR se distribuyen entre las categorías B y D pero no hay diferencias estadísticamente significativas en la TI. Sólo el 16,1% de los embriones (Categoría A) tuvieron una tasa de implantación mayor respecto al resto de las categorías. Sin embargo, con el TLC el 70,7% de los embriones tuvieron una TI mayor (estadísticamente significativa) comparable a la categoría A de ASEBIR. (Gráfica 3 y 4).

Por otra parte, al comparar las tasas de Implantación (TI) para cada modelo de clasificación se observó que no existe diferencia estadísticamente significativa en las categoría A a la C en el grupo morfocinético pero si entre éstas y las categorías D y E mientras



que en los clasificados por ASEBIR solo el 16.1% de los embriones (categoría A) presentaron una diferencia estadísticamente significativa y mayor con respecto a las demás categorías.

Esta información permite concluir por una parte que la selección morfológica incluso con la división temprana, no tiene la capacidad para categorizar una parte importante de los embriones y por otra que el análisis morfocinético es más homogéneo y por tanto facilita la identificación de los embriones con un gran potencial de implantación con morfología similar, por tanto es realmente la combinación de los dos sistemas una opción más eficaz para la selección del embrión a transferir.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alpha Scientist in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Reprod Biomed Online* 22, 632-646.

Bellver J, Mifsud A, Grau N, Privitera L, Meseguer M. Similar morphokinetic patterns in embryos derived from obese and normoweight infertile women: a time-lapse study. *Hum Reprod* 2013;28: 794-800.

Ciray HN, Aksoy T, Goktas C, Ozturk B, Bahceci M. Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media sibling oocyte study. *J Assist Reprod Genet* 2012;29:891-900.

Cruz M, Gadea B, Garrido N, Pedersen KS, Martinez M, Perez-Cano I, et al. Embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging. *J Assist Reprod Genet* 2011;28:569-73.

Ciray HN, Uglu U, Tosun s, Erden HF, Bahceci M. Outcomes of 1114 ICSI and Embryo transfer cycles of women 40 years and over. *Reprod Biomed Online* 2006;1 3:516-522; Lemen JC, Agerholm I, Ziebe S. Kinetic markers of human Embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008a; 17:385-391.

Dal Canto M, Cotichio G, Mignini Renzini M, De Ponti E, Novara PV, Brambillasca F, et al. Cleavage Kinetics analysis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation. *Reprod Biomed Online* 2012 Nov;25 (5):474-480.

Davies, S., Christopikou, D., Tsova, E., Karagianni, A., Handyside, A.H., Mastrominas, M. 2012. Delayed cleavage divisions and a prolonged transition between 2- and 4-cell stages in embryos identified as aneuploid at the 8-cell stage by array CGH. *Hum Reprod.* 27,0-217.

De los Santos MJ, Mercader A, Galán A, Albert C, Romero JL, Pellicer A. Implantation rates after two, three, or five days of embryo cultura. *Placenta* 2003; 24 Suppl B: S13-9.

Edwards, R.G., Purdy, J.M., Steptoe, P.C., Walters, D.E., 1981. The growth of human preimplantation embryos in vitro. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 141,408-416.

Escrich L, Grau N, Meseguer M, Pellicer A, Escriba MJ. Morphologic indicators predict the stage of chromatin condensation of human germinal vesicle oocytes recovered from stimulated cycles. *Fertil Steril* 2010;93:2557-2564.

Hill, G.A., Freeman, M., Bastias, M.C., Rogers, B.J., Herbert, C.M., Osteen, K.G., Wentz, A.C., 1989. The influence of oocyte maturity and Embryo quality on pregnancy rate in a program for in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 52, 801-806.

Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Grondahl ML, Kesmodel US, Ingerslev HJ. A randomized clinical trial comparing embryo culture in a conventional incubator with a time-lapse incubator. *J Assist Reprod Genet* 2012 ;29(6):565-72.

Kuliev A, Cieslak J, Verlinsky Y: Frequency and distribution of chromosomal abnormalities in human oocytes. *Cytogenet Genome Res* 2005, 111:193-198.

Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Lappi M, Ruberti A, Farfalli V: Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. *Fertil Steril* 2007, 87:534-541.

Lemmen J, Agerholm I, Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using

time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reproductive biomedicine online* 2008;17(3):385-2671.

Meseguer M, Rubio I, Cruz M, Basile N, Marcos J, Requena A. Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertil Steril* 2012;98:1481-9.

Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsoe KM, Ramsing NB, Remohi J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* 2011 Oct;26 (10):2658-2671.

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

Montag M, Liebenthron J, Köster M. Which morphological scoring system is relevant in human Embryo development? *Placenta* 2011;32,S252-S256.

Muñoz M, Cruz M, Humaidan P, Garrido N, Perez-Cano I, Meseguer M. Dose of recombinant FSH and oestradiol concentration on day of HCG affect embryo development kinetics. *Reprod Biomed Online* 2012;25:382-9.

Munné S, Sandalinas M, Magli C, Gianaroli L, Cohen J, Warburton D: Increased rate of aneuploid embryos in young women with previous aneuploid conceptions. *Prenat Diagn* 2004, 24:638-643.

Munné S, Chen S, Colls P, Garrisi J, Zheng X, Cekleniak N, Lenzi M, Hughes P, Fischer J, Garrisi M, Tomkin G, Cohen J: Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reprod Biomed Online* 2007, 14:628-634.

Nakahara T, Iwase A, Goto M, Harata T, Suzuki M, Ienaga M, Kobayashi H, Takikawa S, Manabe S, Kikkawa F, Ando H. Evaluation of the safety of time-lapse observations for human embryos. *J Assist Reprod Genet.* 2010;27(2-3):93-6.

Rubio I, Kuhlmann R, Agerholm I, Kirk J, Herrero J, Escriba MJ, et al. Limited Implantation success of direct-cleaved

human zygotes: a time-lapse study. *Fertil Steril* 2012 Dec;98 (6):1458-1463.

Seli E, Vergouw CG, Morita H, Botros L, Roos P, Lambalk CB, Yamashita N, Kato O, Sakkas D: Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer. *Fertil Steril* 2010, 94:535-542.

Vanneste E, Voet T, Le Caignec C, Ampe M, Konings P, Melotte C, Debrock S, Amyere M, Vikkula M, Schuit F, Fryns JP, Verbeke

G, D'Hooghe T, Moreau Y, Vermeesch JR: Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med* 2009, 15:577-583.

Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM, et al. Non invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol* 2010;28 (10): 1115-1121.

Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM, et al. Non invasive

imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol* 2010;28 (10): 1115-1121.

Yang, Z., Liu, J., Collins, G., S., Salem, S., A., Xiaohong, L., Lyle, S., S., Peck, A., C., Sills, E., S., Salem, R., D., . Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Mol Cytogenet.* 2012; 5:24.

## FALLO EN ACTIVACIÓN OVOCITARIA ¿OVOCITO O ESPERMATOZOIDE?

Alan Thornhill  
Guy's Hospital, London, UK

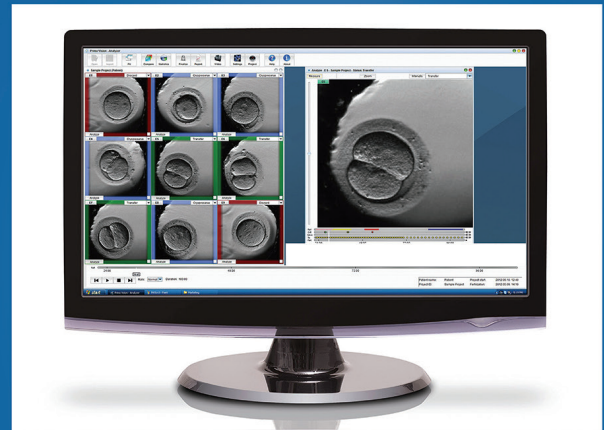


## Modular y Ampliable



- » Cada microscopio es programable de forma independiente
- » Adaptable a cualquier incubador
- » Mínima exposición a la luz

## Time-Lapse Embriomonitorización

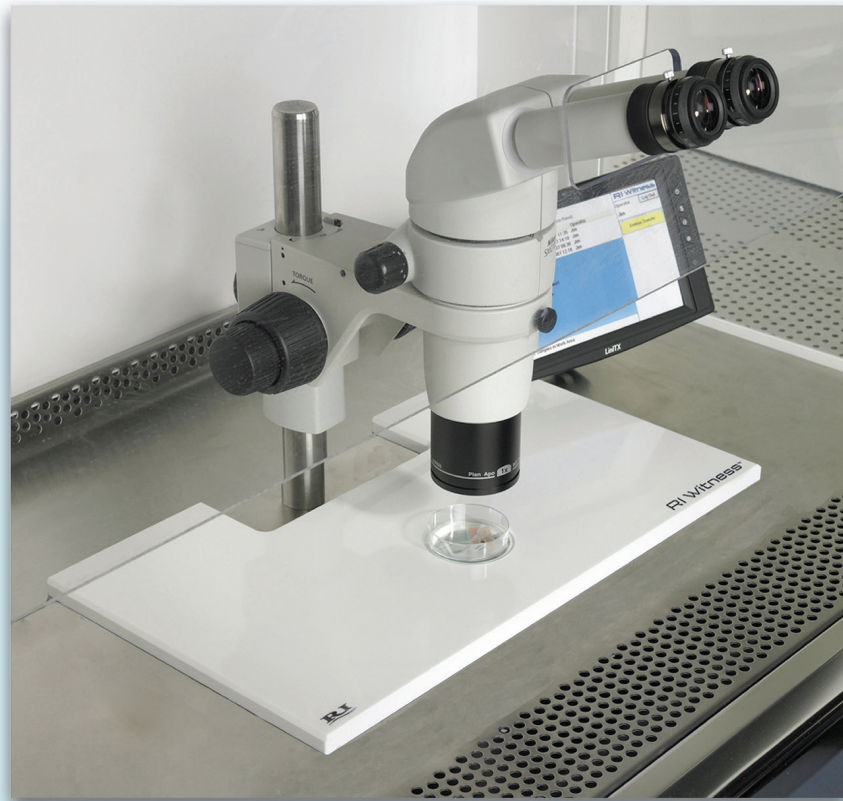


- » Permite el acceso remoto
- » Captura, Analiza y Reporta
- » Presenta informes automáticos completos





# RI Witness™



## Pantalla táctil de captura de datos



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

## Lector por radiofrecuencia



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

## ESTADO ACTUAL DEL GRUPO DE INTERÉS DE CALIDAD DEL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Antonio L. González-Utor, Nereida Ortiz, Vicente Badajoz, Nicolás Prados, Yolanda Cabello, Antonio Urrés, Marissa Riqueros, Fina Gomez, Juan Manuel Moreno, Emilio Gómez y José Antonio Castilla.

Comisión Permanente del Grupo de Interés de Calidad del Laboratorio de Reproducción Asistida. ASEBIR.

[algonzautor@asebir.com](mailto:algonzautor@asebir.com)

### PERIODO

En esta memoria se presentará la actividad realizada desde la última notificación, expuesta en la ponencia del Estado Actual del Grupo de Interés durante el VI Congreso de ASEBIR de Girona en Octubre de 2011, hasta la fecha de publicación de este resumen, Septiembre de 2013. Es posible que puedan existir cambios debido a que aún faltan dos meses para la exposición de esta charla en el VII Congreso de ASEBIR que se celebra en Noviembre de este año en Sevilla.

### COMPOSICIÓN DEL GRUPO

Desde la creación del Grupo de Interés el 8 de Octubre de 2010, el número de asociados inscritos es de 21, de los cuales 11 de ellos son miembros del Comité Permanente. En el periodo que hablamos ha habido una sustitución por baja en la comisión y 5 nuevos inscritos.

### OBJETIVOS Y PROYECTOS DEL GRUPO

Durante la primera exposición de la actividad del Grupo de Interés, se expuso los cuatro objetivos y proyectos a desarrollar. Estos eran:

- Indicadores de Calidad.
- Control de Calidad.
- Norma Sectorial PNE179007.
- Documentos de Formación y Planes de Control.

### INDICADORES


Se mantienen el número de indicadores, con las últimas incorporaciones, presentadas durante el Congreso de Girona. Se ha realizado una nueva revisión, Febrero de 2013, de los indicadores correspondientes al Registro SEF del 2010. Durante el Congreso de ASEBIR se expondrán la tercera revisión con los datos obtenidos del registro 2011.

Además decir que los indicadores de consenso (tanto bibliográficos como obtenido por los miembros GI) de Tasa de supervivencia embrionaria (CRIO) y combinados entre bibliográficos y registro de Porcentaje de fecundación normal (FIV/ICSI), han pasado a ser indicadores de Registro, por su incorporación en el registro SEF.

Por tanto los indicadores son:

Además en estos estándares se ha calculado el intervalo de confianza al 95% para el percentil obtenido (números entre paréntesis en las fichas de indicadores). Estos indicadores se han publicado en la página web de ASEBIR, dentro del apartado de nuestro GI.

Los indicadores de ASEBIR han sido incluidos, junto a otros, en la nueva norma PNE 179007 que saldrá en



**FICHAS DE INDICADORES DE CALIDAD 2013**

**GRUPO DE INTERÉS EN CALIDAD EN EL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA**

**LISTADO DE INDICADORES EVALUADOS.**

	Inicio	1ª Rev.	2ª Rev.
<b>Andrología:</b>			
• Porcentaje de recuperación de espermatozoides móviles (REM)	Oct.09		
• Test de descongelación	Oct.09		
<b>Embriología:</b>			
• Porcentaje de fecundación normal (FIV/ICSI)	Oct.09	Nov.11	Feb.13
• Porcentaje de fallo total de fecundación normal (FIV/ICSI)	Oct.09		
• Tasa de supervivencia embrionaria (CRIOPRESERVACIÓN)	Oct.09	Nov.11	Feb.13
<b>Gestación:</b>			
• Porcentaje de gestación clínica por transferencia	Oct.09	Nov.11	Feb.13
• Porcentaje de gestación clínica en inseminación artificial	Oct.09	Nov.11	Feb.13
• Número de embriones transferidos por embarazo		Nov.11	Feb.13
• Tasa de implantación		Nov.11	Feb.13
• Porcentaje de ovocitos degenerados post-ICSI		Nov.11	Feb.13
• Porcentaje de embriones evolutivos o utilizados		Nov.11	Feb.13

En cuanto a los indicadores obtenidos DE REGISTROS, como ya se comentó, se han expresado los estándares deseados de cumplimiento en tres categorías:

- Nivel Bajo: Definido como el nivel mínimo (de exigencia) cuyo valor debe ser superior al percentil 10 del valor medio de referencia.
- Nivel Medio: Definido como el nivel óptimo cuyo valor debe ser superior al percentil 30 del valor medio de referencia.
- Nivel Alto: Definido como el nivel deseable cuyo valor debe ser superior al percentil 70 del valor medio de referencia.

breve a información pública como comentaremos en su apartado.

### CONTROL DE CALIDAD (CC)

Finalizada la primera experiencia del Control de Calidad Externo (CCEX) de 2011 con 51 centros inscritos, se ha realizado el segundo control correspondiente a 2012. En este se realizó algunas modificaciones de mejora con respecto al primero, como fueron:

- La inclusión de datos citomorfológicos tanto para embriones como para blastocistos

siguiendo nomenclaturas de GI de Embriología. Los datos son:

1. Embriones D+2, D+3: Nº de células, Tasa de fragmentación, Tamaño, Multinucleación, Vacuolas, Anillo/halo acitoplásmico y Zona Pelúcida.
2. Embriones D+4, D+5: Mórula (D+4), compactación y Blastocisto (D+5) según su expansión, y Trofoectodermo y Masa Celular Interna (MCI).

- Realización de consenso con grupo de expertos en reunión "in situ".
- Material embriotestado para comprobación de citotoxicidad. Incluyendo documento de instrucciones para realización del test de supervivencia espermática.

Se incorporó también una variable de Control de Calidad Interno (CCI) para uso de los laboratorios. Esta opción fue demandada por laboratorios medios/grandes con personal suficiente para controlar a todos los sus miembros independiente del CCEX. Las ventajas son:

- Incorporación de datos individuales de los miembros de un laboratorio.
- Proceso e informe de datos individualizados del laboratorio.

En 2012 tuvimos un total de 45 inscripciones al CCEX y 33 al CCI. El CC de 2013 ya ha sido publicitado, tanto por vía e-mail como en revista, manteniéndose los mismos criterios que el año anterior.

Para darle un mayor impulso al CC, ASEBIR en el VII Congreso de Sevilla,

se entregará un tarjetón de publicidad con bolígrafo, para recordar a todos los asociados la importancia de inscribirse a él.

Por parte de la Junta Directiva, se mantienen conversaciones con la asociación de embriólogos clínicos portugueses para su internacionalización. Para ello se crearía en la plataforma una zona traducida al portugués.

También se están desarrollando ideas para el CC de 2014. Junto con el Centro de Cirugía de Mínima Invasión (CCMI) Jesús Usón de Cáceres, se está preparando un nuevo sistema de comprobación de embriotoxicidad, pero no en material sino en medios de cultivo. Este podrá ser testeado con test de supervivencia espermática o mediante embriones de ratón (MEA). Para esto último, el CCMI está desarrollando el protocolo de envío de estos embriones. Es un proyecto aún muy incipiente, que a lo largo del año comprobaremos su viabilidad.

#### NORMA SECTORIAL PNE 179007

Desde la creación del Grupo de Trabajo 9 sobre Calidad en los Laboratorios de RHA dentro del Comité Técnico de Normalización AEN/CTN 179, se han realizado un total de 10 reuniones presenciales. La primera fue el 25 de Noviembre de 2011 y la última 14 de Mayo de 2013. Durante ellas se han realizado un total de 20 borradores que han sido evaluados por extenso grupo de personas que incluyen a: administraciones públicas, colegios profesionales, universidades,

asociaciones científicas, aseguradoras sanitarias y centros de RHA.

El pasado 16 de Julio de 2013, la propuesta de norma fue enviada al comité AEN/CTN 179 de AENOR para su aprobación. Esta fue entregada el 30 de Julio de 2013. Este documento es el que se va a enviar a Información Pública, a través de su publicación en el BOE. A fecha de hoy aun no se ha producido la publicación, pero esperamos que para el inicio del VII Congreso, esté ya.

No nos extendemos más en el desarrollo de este trabajo ya que la Dra. Nereida Ortiz, en su ponencia "Conceptos de la nueva Norma Sectorial UNE 179007 para el laboratorio de FIV" la expondrá con todo detalle.

#### DOCUMENTOS DE FORMACIÓN Y PLANES DE CONTROL

Este apartado se ha postergado hasta que no estuviera publicada la norma anteriormente comentada, debido a las interrelaciones que existen entre ambos apartados. Así se prevé en un futuro empezar a finalizar estos documentos y fichas de control siendo coherentes con los principios expuestos en la norma.

Además, por parte del GI, creemos que una vez publica esta, debemos de realizar la tercera revisión del I Cuaderno de Embriología Clínica acerca de "Recomendaciones sobre Recursos Humanos y Físicos del Laboratorio de Reproducción". Estas directrices de ASEBIR publicadas en las dos ediciones (2005 y 2008) han quedado obsoletas tras la elaboración de la nueva norma.

#### OTROS OBJETIVOS Y PROYECTOS DE LA JUNTA DIRECTIVA

##### CURSO DE FORMACIÓN ON-LINE

A mediados del mes de Junio de 2012, la vocalía de formación de la Junta Directiva de ASEBIR pide la realización para el año 2013, de un curso de formación on-line realizado por el GI. Tras debate en el grupo se pensó en realizarlo con el siguiente tema "Gestión de Calidad: Aplicación para la Mejora de los Procesos del Laboratorio





de RHA". Dada la imposibilidad de realizar el diseño del curso por los miembros del grupo, se pensó en buscar a empresas que lo pudieran hacerlo, con las siguientes necesidades:

Envío de borrador con los contenidos, objetivos, organización y costes. El curso dentro de su amplitud debería de ser de 3 a 6 meses con unas 50 a 80 horas lectivas, con teoría y en caso de necesidad demostraciones prácticas en video. Debe de incluir test de autoevaluación y examen. El curso se incluirá en la plataforma de formación de ASEBIR. El temario debe de incluir al menos:

- Introducción.
- El enfoque de la gestión de calidad en el laboratorio
- Sistema de calidad EN ISO 9001:2008
- Implementación del sistema de calidad
- Mejora continuada
- Calidad Total
- Introducción a la nueva norma sectorial UNE 179007

Se presentaron 4 propuestas realizadas por empresas (Isotader, AENOR, Global Group y CEIFER Calidad). El 13 de Noviembre de 2012, se envió a la vocalía de formación las propuestas. Posteriormente, se nos comunicó la imposibilidad de realizar el curso debido a cuestiones puramente mercantiles encontradas entre ASEBIR y las diferentes empresas, quedando cerrado el tema en este punto.

## PARTICIPACIÓN DEL GI EN LOS CONGRESOS DE ASEBIR

### VI CONGRESO, GIRONA 2011

Durante el Congreso de Girona de 2011 se llevó a cabo el curso precongreso organizado por nuestro GI en colaboración con ALPHA Scientists in Reproductive Medicine denominado GESTIÓN DE CALIDAD EN EL LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA CLÍNICA. Entre los ponentes figuran dos miembros de nuestro grupo. La sesión fue un éxito de participación con ocupación máxima de la sala. El diseño fue el siguiente:

Moderadoras la Dra. Basak Balaban

(Executive Committee de Alpha) y la Dra. Ana Cobo (Miembro de ASEBIR y Executive Committee de Alpha).

### Programa Científico

- El control en el laboratorio de embriología clínica. 30 años de evolución.  
*Dra. Basak Balaban (American Hospital, Istanbul - Turkey).*
- Diseño del laboratorio de embriología.  
*Dr. Klaus Wiemer (Northwest Center for Reproductive Sciences, Seattle, USA).*
- Papel de la metrología aplicada al laboratorio de embriología.  
*Dr. Nicolás Prados (IVI, Sevilla).*
- Parámetros cruciales de control en el cultivo embrionario. Efectos en el desarrollo.  
*Dra. Laura Rienzi (Centro GENERA, Clinica Valle Giulia, Roma).*
- Indicadores de calidad de ASEBIR. Fase Técnica.  
*Dr. Juan Manuel Moreno (Clínica Vistahermosa, Alicante).*

En cuanto al propio Congreso, junto con la Vocalía de Congreso, el apartado de charlas correspondientes al GI quedó diseñado de la siguiente forma:

Moderadores: Dr. Juan Manuel Moreno (Clínica Vistahermosa, Alicante) y Dra. Laura Marqués (Clínica Sagrada Familia, Barcelona).

- Estado actual del Grupo de Interés de Calidad del Laboratorio de Reproducción Asistida.  
*Dr. Antonio L. González-Utor, Centro Masvida Reproducción, Sevilla.*
- Medidas de seguridad en el manejo de las muestras biológicas.  
*Dra. Montse Boada, Institut Universitari Dexeus, Barcelona.*
- Control de calidad en los procesos del laboratorio de embriología.  
*Dr. Klaus Wiemer, Northwest Center for Reproductive Sciences, Seattle, USA.*

### VII CONGRESO, SEVILLA 2013

Para el próximo Congreso de ASEBIR en Sevilla 2013, se han propuesto a la vocalía de congresos de la Junta Directiva 11 ponencias sobre distintos temas:

Conceptos de la nueva Norma Sectorial UNE 179007 para el laboratorio de FIV, Factores biofísicos aplicados al cultivo embrionario. Cultivo embrionario: Requisitos y condiciones. Día a día de un sistema de calidad en el laboratorio de FIV. Experiencia de control de calidad interno de análisis de semen. Metrología aplicada al laboratorio de embriología clínica. La gestión de compras en el laboratorio de embriología. Calidad en la escritura de artículos en ciencias de la salud. Calidad en la presentación de una ponencia. Sistemas de autoevaluación: Indicadores de calidad. Sistemas de gestión de calidad en el laboratorio de reproducción asistida.

La vocalía de congresos nos comentó que las charlas elegidas por la Junta Directiva fueron las dos primeras expuestas. Por tanto, el diseño de las ponencias del Grupo de Interés ha quedado de la siguiente forma:

Moderadora: Dra. Yolanda Mínguez, IVI Madrid.

- Estado actual del Grupo de Interés de Calidad del Laboratorio de Reproducción Asistida.  
*Dr. Antonio L. González-Utor, Centro Masvida Reproducción, Sevilla.*
- Conceptos de la nueva Norma Sectorial UNE 179007 para el laboratorio de FIV.  
*Dra. Nereida Ortiz, Clínica Inst. Europeo De Fertilidad, Madrid.*
- Cultivo embrionario: Medios y condiciones biofísicas.  
*Dra. Gloria Calderón. IVI Barcelona.*

También durante los cursos precongreso, el Grupo de Interés va a realizar una reunión tipo charla abierta sobre el Control de Calidad e Indicadores. Se ha pedido expresamente al comité organizador del congreso que la inscripción fuera gratuita para poder tener un gran aforo. En ella se expondrá a todos los presentes:

- Resultados de los CCEX 2011 y 2012, donde se debatirá sobre diferencias en cuanto a clasificación embrionaria encontradas.
- Publicación de los indicadores en su tercera revisión.

## CONCEPTOS DE LA NUEVA NORMA SECTORIAL UNE 179007 PARA EL LABORATORIO DE FIV

Nereyda Ortiz Piñate  
Clínica Instituto Europeo de Fertilidad, Madrid  
[nereidaortiz.ief@gmail.com](mailto:nereidaortiz.ief@gmail.com)

Los profesionales dedicados al Laboratorio de Reproducción Humana Asistida (LRHA), al servicio de una sociedad de bienestar, reconocen la necesidad de una norma específica que permita una gestión eficaz de la calidad.

A pesar del entorno legal que en nuestro país rodea a la Reproducción Humana Asistida, y de que la asistencia a los pacientes con esterilidad es un hecho cada vez más relevante y con impacto socio-sanitario, el Laboratorio de Reproducción Humana Asistida necesita una mayor definición en prácticamente todas sus áreas:

- formación de profesionales;
- recursos humanos y materiales;
- requerimientos y seguimiento de la actividad;
- áreas específicas de ejercicio profesional, etc.

La definición de estas áreas redundará en un beneficio en la calidad y seguridad asistencial, así como para el ejercicio profesional.

Existen a nivel nacional e internacional varias iniciativas, sobre todo de manos de las sociedades científicas, que persiguen mejorar la calidad asistencial, al menos en parte, a través de:

- Programas de formación en Reproducción Humana Asistida-Embriología Clínica, incluidos másteres y postgrados universitarios;
- Certificados de Embriología Clínica;
- Guías de buenas prácticas;
- Recomendaciones de recursos humanos y físicos de los laboratorios.

Estas iniciativas han sido sin duda de mucha ayuda, pero no son suficientes

para lograr unificar criterios de calidad en todas las áreas del LRHA.

Actualmente muchas unidades de Reproducción Humana Asistida están certificadas por la Norma ISO 9001, sin embargo es necesario que los requerimientos de dicha Norma se adapten y amplíen para su aplicación en el LRHA. Por este motivo, surgió un proyecto hace más de 2 años, promovido por ASEBIR, de crear un grupo de trabajo para desarrollar una normativa a nivel nacional (Norma UNE) con aplicaciones específicas al LRHA.

Se persigue así conseguir una Norma (UNE 179007) más precisa y amplia en relación con el LRHA que incluye en su contenido a la Norma ISO 9001, de modo que una Unidad de Reproducción Humana Asistida podría en un mismo acto certificarse para ambas.

Entre otros, los propósitos para la elaboración de la Norma UNE 179007 para el laboratorio de FIV han sido:

- Unificar criterios de gestión de calidad del LRHA;
- Ayudar a la planificación del LRHA mediante la gestión por procesos;
- Unificar:
  - Terminología específica del LRHA;
  - Criterios mínimos en cuanto a recursos humanos, infraestructura y requisitos ambientales;
  - Criterios mínimos de seguimiento y evaluación de los procesos;
  - Criterios mínimos de aseguramiento y control de calidad;
- Facilitar la adaptación a los complejos requisitos legales que afectan al LRHA: trazabilidad,

calidad ambiental, destino preembrionario, etc.;

- Aportar requisitos mínimos en la comunicación con los clientes y proveedores.

### OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta Norma especifica los requisitos para un sistema de gestión de la calidad para organizaciones de Reproducción Humana Asistida y es de aplicación a los laboratorios de las unidades asistenciales en los que se realicen actividades relacionadas con gametos o preembriones con dicha finalidad, ya sea para uso propio, para donación dentro de la pareja o fuera de ella. El alcance aplica hasta que se de el uso previsto a los gametos o preembriones conforme a la legislación vigente.

Las unidades asistenciales a las que aplica esta norma se pueden agrupar en: laboratorio de andrología, laboratorio de embriología y laboratorio de crioconservación.

Actualmente todos los capítulos de la Norma han sido redactados, revisados y consensuados por un Grupo de Trabajo que fue formado por representantes de las distintas Asociaciones Científicas y Unidades de Reproducción Humana Asistida a nivel nacional, colegios profesionales de licenciados en biomedicina, Ministerio y Consejerías de Sanidad, etc.

El documento final de esta Norma UNE estimamos que pueda ser publicado de forma oficial a finales de este año, el cual esperamos se convierta en una sólida herramienta de trabajo para la unificación de criterios de calidad en el Laboratorio de Reproducción Humana Asistida.

## CULTIVO EMBRIONARIO: MEDIOS Y CONDICIONES BIOFÍSICAS

Gloria Calderón de Oya  
PhD Embryotools  
[gloria.calderon@embryotools.com](mailto:gloria.calderon@embryotools.com)

### INTRODUCCIÓN

En las últimas dos décadas, los avances conseguidos en las técnicas de Reproducción Asistida, han proporcionado un aumento considerable en los resultados clínicos. Este aumento significativo en las tasas de embarazo clínico e implantación embrionaria, se deben principalmente a las mejoras introducidas en los laboratorios de Fecundación in vitro (FIV). No debemos olvidar que cuando empezaron las técnicas de reproducción asistida, los laboratorios de FIV tomaron prestados de los laboratorios de cultivo celular, los equipos, técnicas de cultivo y medios de cultivo diseñados para el cultivo celular, pero no desarrollados específicamente para el cultivo de gametos y embriones humanos. La introducción de controles de calidad, nuevo equipamiento diseñado específicamente para el cultivo de gametos y embriones humanos, la optimización y desarrollo de nuevos medios de cultivo han contribuido significativamente en el aumento de la eficiencia de los laboratorios de FIV. La experiencia adquirida por el personal especializado en las técnicas de FIV (embriólogos básicos y clínicos), el desarrollo y puesta a punto de sistemas de cultivo optimizados, el mayor control y cuidados a los que sometemos los gametos y embriones humanos, han jugado un papel importantísimo en la optimización de los resultados clínicos obtenidos. (Sunde y Balaban, 2013)

### SISTEMA DE CULTIVO

Todos los laboratorios de FIV deben dedicar su mayor esfuerzo a conseguir un sistema de cultivo estable que no afecte el desarrollo embrionario in vitro.

El Sistema de Cultivo engloba todo el equipamiento, plásticos, medios de cultivo y aceite utilizados en los laboratorios de FIV y su principal

finalidad es mantener la temperatura, el pH y la osmolaridad constantes a lo largo de todo el cultivo embrionario.

Todos sabemos que los requerimientos físico-químicos de los gametos y embriones humanos son muy distintos a los de las células somáticas. Fue en la década de los 90 cuando se empezaron a diseñar equipos y materiales específicos para el cultivo de gametos y embriones humanos. También se empezaron a introducir los parámetros básicos de control de calidad y se empezó a prestar atención a la calidad del aire de los laboratorios de FIV. Fue entonces, cuando la FIV empezó a ser realmente efectiva ya que la introducción de todas estas mejoras consiguió aumentar de forma significativa los resultados clínicos obtenidos en cada ciclo. (Biggers, 1998).

### TEMPERATURA

Sabemos que la temperatura del cuerpo humano es de 37°C y por lo tanto la temperatura de cultivo tiene que estar alrededor de esa cifra (Higdon et al., 2008). El más afectado por los cambios de temperatura es el ovocito. Si la temperatura del ovocito baja a 34°C, sabemos que se puede romper la placa metafásica pudiendo inducir anomalías cromosómicas cuando la placa se vuelve a formar al llegar la temperatura a 37°C. También pequeñas variaciones en la temperatura, durante el manejo habitual de los gametos y embriones, pueden alterar el pH del medio alterando el posterior desarrollo embrionario.

El momento más crítico en cuanto a cambios en la temperatura, es durante la punción folicular para la recuperación de los ovocitos. Hay que prestar especial atención en la forma en que se realiza la punción y el material utilizado durante la misma para minimizar todo lo posible, estos cambios en la temperatura.

### PH

Una perfecta revisión de lo que es el pH la podemos encontrar en la publicación de Pool (2004). Pero un concepto importante a resaltar es que el pH es dinámico. Depende de la asociación/disociación de los componentes del medio y de cualquier parámetro que influya en este balance, como por ejemplo, la temperatura. De lo anterior se deduce que el pH varía y que puede hacerlo muy rápido. Siempre tenemos que recordar que el pH va a tardar un tiempo en equilibrarse y que estas variaciones van a afectar al posterior desarrollo embrionario debido al estrés creado al embrión para defenderse de las condiciones adversas.

El rango de pH para el cultivo de gametos y embriones humanos es 7,2-7,4. Para llegar a estos niveles, el medio de cultivo necesita CO<sub>2</sub>. No hay que olvidar que la concentración de CO<sub>2</sub> necesaria para obtener este rango de pH depende de muchas cosas. Una de ellas es la altura sobre el nivel del mar en la que se encuentra el centro. Otra muy importante es la cantidad de Buffer bicarbonato que contenga el medio que se utilice (Swain, 2010). Siempre hay que seguir las instrucciones del fabricante de los medios de cultivo en cuanto a los valores de pH óptimos para ese medio y variar la concentración de CO<sub>2</sub> de los incubadores para obtener ese nivel de pH.

### OSMOLARIDAD

La osmolaridad de los medios de cultivo la fijan los fabricantes. Los embriones de mamíferos se desarrollan adecuadamente en un rango de 255-295mOsm/kg. El mantener la osmolaridad dentro de este rango es crucial para el buen desarrollo de los embriones humanos. El problema con que nos encontramos es que sin darnos cuenta, es muy fácil alterar la

osmolaridad del medio. No hay que olvidar que el 95% de los medios es agua, que su evaporación es relativamente fácil si no tenemos una buena técnica de alicuotado de los medios y durante la preparación de las placas de medio de cultivo para los gametos y embriones humanos. Siempre se debe evitar el alicuotar medios y preparar las placas en las superficies calefactadas, ya que favorecemos la evaporación del agua. También el tiempo que tardamos en preparar las placas, puede variar la osmolaridad del medio. Es aconsejable no preparar nunca más de 2 placas a la vez. (Swain et al., 2012).

## ACEITE MINERAL

El aceite mineral es nuestro gran aliado para minimizar los cambios de temperatura, pH y osmolaridad de los medios de cultivo.

Es por todos aceptado que el aceite mineral es necesario para el cultivo de gametos y embriones humanos. Actúa como barrera protectora en muchos aspectos. Además de ayudarnos a minimizar los cambios de temperatura, pH y osmolaridad, permitiéndonos trabajar más tiempo fuera de los incubadores, también actúa absorbiendo compuestos orgánicos volátiles (VOC) y otros tóxicos frecuentes en el ambiente de los laboratorios de FIV protegiendo y ayudando al buen desarrollo embrionario in vitro. Lo más importante es como lo utilizamos, como lo preparamos, como lo equilibramos y cuánto tiempo lo tenemos a 37°C dentro de los incubadores. El aceite por el hecho de ser inerte, absorbe todos los componentes del medio de cultivo, tóxicos y también la temperatura. Si no le prestamos gran atención puede llegar a sobresaturarse de VOC y tóxicos, liberándolos directamente al medio de cultivo. Si no está equilibrado correctamente con medio de cultivo, en el momento en que los pongamos en contacto, absorberá sus componentes alterando las condiciones del medio. Si no está a 37°C cuando lo añadamos a las gotas de cultivo, absorberá la temperatura para alcanzar los 37°C, bajando la temperatura del medio alterando su pH, afectando el desarrollo embrionario.

## INCUBADORES

Los incubadores son los equipos de mayor importancia en los laboratorios de FIV, ya que es en su interior donde vamos a realizar el cultivo embrionario. Hay que prestarles mucha atención, cuidados y sobretodo, someterlos a controles de calidad estrictos. Los incubadores de por sí, tienden a desviarse de los parámetros a los que hemos decidido trabajar. Esto implica un control diario de la temperatura, gases que utilicemos y también es recomendable medir el pH de los medios al menos una vez a la semana. Debemos tener muy presente que cada incubador se comporta de manera diferente y lo que es válido para uno, no tiene por qué serlo para otro. Las sondas externas de medición de temperatura, CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> son un buen sistema de control de calidad de los parámetros establecidos para ese incubador. No debemos nunca controlar los incubadores a través del Display, ya que no refleja las condiciones reales internas y son estas, las que debemos controlar estrictamente. En los incubadores, todo importa: desde la manera y frecuencia con la que abrimos las puertas hasta donde colocamos las placas de cultivo.

Los incubadores más utilizados en los laboratorios de FIV son los utilizados para el cultivo celular. Son de gran tamaño y poco estables según el número de veces que se abra la puerta, ya que en cada apertura baja la temperatura y la concentración de gases, tardando varias horas en recuperar las condiciones necesarias. Con estas variaciones de temperatura y gases se altera el pH del medio de cultivo afectando el posterior desarrollo embrionario. En los últimos años, se han empezado a fabricar incubadores específicos para el cultivo de gametos y embriones humanos. Las principales diferencias con los habituales para el cultivo celular es que la cámara de cultivo es mucho más pequeña consiguiendo de este modo que la temperatura sea más estable en toda la cámara y que haya menos variaciones en las concentraciones de gases cada vez que se abren. De esta forma, consiguen recuperar sus condiciones de forma más rápida afectando menos el desarrollo embrionario.

## CAMPANAS DE FLUJO LAMINAR

También en la década de los 90 se empezaron a fabricar campanas de flujo laminar adecuadas para los tratamientos de reproducción asistida en el humano. La introducción de las superficies calefactadas en las campanas ha permitido realizar los procedimientos habituales de FIV de forma más precisa.

Hay que tener en cuenta que las superficies calefactadas ayudan a que la temperatura del cultivo baje de forma más lenta pero aun así, se dispone de un tiempo determinado para los procedimientos. Este periodo de tiempo será más o menos largo en función de la forma de cultivo elegida.

## PLACAS DE CULTIVO

Se han probado todo tipo de placas y tubos para el cultivo de los gametos y embriones humanos. Desafortunadamente, la mayoría de los plásticos son tóxicos o liberan VOC afectando el desarrollo embrionario. Es altamente recomendable que todos los plásticos que entren en contacto directo con gametos y embriones, sean testados con el test de ratón (MEA) para comprobar que no afectan al desarrollo embrionario. Debido a los procesos de esterilización del plástico y al empaquetado, es altamente recomendable el airear todos los plásticos al menos 48h antes de ponerlo en contacto con gametos y embriones

Según el tipo de placa que se elija para el cultivo embrionario (petri, 4 pocillos, tubo, petri con pocillo central etc...) determinara la forma de cultivo. Los cultivos en tubo han sido abandonados hace tiempo ya que al no poder utilizar aceite mineral, el sistema de cultivo no es estable. Lo más habitual es el cultivo en microgota cubierta con aceite mineral. El tamaño de la microgota varía según los laboratorios y parece no afectar al desarrollo embrionario siempre que se mantenga un volumen mínimo de unos 15-20 microlitros.

También en los últimos años se han diseñado placas de cultivo específicas para el cultivo de gametos y embriones

humanos, siendo más seguras debido a los controles de calidad a las que los someten y al tipo de empaquetado que permite la liberación de VOC antes de su uso.

## MEDIOS DE CULTIVO

Cuando a finales de los 70 empezaron las técnicas de FIV, también tomaron prestados los medios de cultivo de los laboratorios de cultivo celular. Básicamente eran soluciones salinas como SOM y similares a los que se les añadía como aporte proteico suero humano. Un claro ejemplo del desconocimiento de los requerimientos de los gametos y embriones humanos, fue el uso generalizado en Europa del medio de cultivo Menezo, diseñado específicamente para el cultivo de embriones bovinos. Este medio estaba suplementado con suero bobino induciendo reacciones alérgicas importantes en algunas pacientes. Fue el los 80 cuando se empezaron a mejorar los medios de cultivo destinados al cultivo de gametos humanos. Algunos ejemplos son el KSOM y HTF usados masivamente por la mayoría de los grupos de FIV. Como aporte proteico se seguía utilizando suero materno o un pool de suero de donantes. Debido al alto riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas, se empezó a utilizar HSA como aporte proteico, originando problemas importantes en los resultados clínicos debido a las variaciones entre e intra lotes. Fue a finales de la década de los 90 cuando se empezaron a diseñar medios específicos para el cultivo de los gametos y embriones humanos. Fue entonces cuando surgieron las 2 principales teorías para el cultivo de gametos y embriones humanos. El cultivo secuencial (Gardner et al., 1998) basado

en dar los requerimientos necesarios en cada momento del desarrollo y el cultivo único (Wiemer et al., 2002), basado en dar todos los requerimientos necesarios y que sea el embrión el que escoja lo necesario en cada momento. Estas 2 teorías siguen en práctica actualmente y son en las que se basan todos los avances en los medios de cultivo. No hay una mejor que otra ya que hay docenas de publicaciones que comparan una teoría con la otra, sin estar claro que una ofrezca mejores resultados clínicos que la otra.

Uno de los puntos cruciales para el director del laboratorio de FIV es que medio de cultivo va a utilizar su laboratorio. De esta decisión dependerá su sistema de cultivo y como deberá controlarlo. Está ampliamente aceptado que la comodidad de la utilización del medio único ahorra tiempo y esfuerzos al personal de FIV ya que se reduce ampliamente el control de calidad y minimiza el número de posibles errores en el cultivo.

## CONCLUSIONES

Uno de los errores más frecuentes que cometemos el personal de FIV, es hacer responsable siempre al medio de cultivo en el momento en que surge un problema en los resultados clínicos. Actualmente los medios de cultivo que podemos encontrar en el mercado, recordemos que no son más de 5 ó 6, están y han sido sometidos a varios años de investigación y a controles de calidad estrictos. Normalmente la causa de su mal funcionamiento es debida a nuestro incorrecto manejo de los mismos. Recordemos que el medio de cultivo es un elemento más y muy importante de nuestro sistema de cultivo pero, si no tenemos en

cuenta los demás elementos, nunca conseguiremos obtener unos resultados clínicos estables.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Biggers JD. Reflections on the culture of preimplantation embryo. *Int. J. Dev. Biol.* 1998;43:34-9

Gardner DK., Lane M. Culture and selection of viable blastocyst: a feasible proposition for human IVF?. *Hum. Reprod. Update* 1997;3:367-82

Higdon HL., Blackhurst DW., Boone W.R. Incubator management in an assisted reproductive technology laboratory. *Fertil. Steril.* 2008; 89:703-10

Pool T. Optimizing pH in clinical embryology. *Clinic. Embryol.* 2004;7:1-17.

Sunde A. & Balaban B. The assisted reproductive technology laboratory: toward evidence-based practice?. *Fertil. Steril.* 2013;100:310-18

Swain JE. Optimizing the culture environment in the IVF laboratory: impact of pH and buffer capacity on gamete and embryo quality. *Reprod. Biomed. Online.*2010;21:6-16

Swain JE., Cabrera L., Xu X., Smith GD. Microdrop preparation factors influence culture-media osmolality, wich can impair mouse embryo preimplantation development. *Reprod. Biomedicine. Online.* 2012;24:142-7

Wiemer KE, Anderson AR, Kyslinger ML, Weikert ML. embryonic development and pregnancies following sequential culture in human tubal fluid and a modify simplex optimized medium containing aminoacids. *Reprod Biomed Online.* 2002 Nov-Dec;5(3):323-7.



## ESTADO ACTUAL DEL GRUPO DE INTERÉS DE GENÉTICA Y REPRODUCCIÓN

Esther Velilla Garcia <sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Interés en Genética y Reproducción, <sup>2</sup> Centro de Medicina Embrionaria, Barcelona, <sup>3</sup> Instituto Marques, Barcelona.  
[esthervelilla@pgdcem.com](mailto:esthervelilla@pgdcem.com)

### INTEGRANTES DEL GRUPO

#### COMITÉ PERMANENTE:

**Presidente:** Esther Velilla

**Secretario:** Mónica Parriego

**Tesorero:** Lorena Rodrigo

**Vocales:** Xavier Vendrell, Carles Giménez, Carmen Rubio, Esther Fernández, Joan Blanco, Fernando Bronet, Cristina Camprubí, Paula Eibes, Sílvia Fernández, Joaquín Rueda, Mireia Sandalinas.

### ESTADO DE LAS CUENTAS

En el 2012, ASEBIR realizó un ingreso de 1200 eur a la cuenta del grupo dejando un

total de 1805 eur. Tras los gastos derivados de dos reuniones del GiGR se finalizó el año con un saldo de 1146.66 eur.

Con el objetivo de reducir costes y poder realizar reuniones periódicas se ha optado en el 2013 por realizar las reuniones online. No se ha realizado ningún otro ingreso en el 2013 por parte de ASEBIR.

### GRUPOS DE TRABAJO

Se han establecido diferentes grupos de trabajo para el desarrollo de los objetivos anuales planteados.

### ACTIVIDADES REALIZADAS:

#### 1 REGISTRO DE DATOS DGP

*1.1 ESCRITURA Y PUBLICACIÓN DEL REGISTRO DE DATOS DE DGP DEL PERÍODO 2008-2009.*

Publicación de los datos en la revista ASEBIR.

*Velilla E, Fernández S, Parriego M, Sandalinas M (2012) IV Recogida de datos de DGP en España: 1 de enero de 2008 a 31 de diciembre de 2009. Revista ASEBIR. Vol 17 (1)*

Grupo de trabajo	Coordinador/a	Participantes
<i>1-REGISTRO DE DATOS DGP(EN COLABORACIÓN CON LA SEF)</i>		
1.1 Artículo recogida de datos 2008-2009 <i>Velilla E, Fernández S, Parriego M, Sandalinas M (2012) IV Recogida de datos de DGP en España: 1 de enero de 2008 a 31 de diciembre de 2009. Revista ASEBIR. Vol 17 (1)</i>	Esther Velilla	Sílvia Fernández, Mónica Parriego, Mireia Sandalinas
1.2 Elaboración de plataforma on line	Esther Velilla	Sílvia Fernández
1.3 Elaboración plataforma registro de datos 2010-2011	Esther Velilla	Sílvia Fernández
<i>2-FORMACIÓN</i>		
2.1 Curso genética ON LINE	Xavier Vendrell	Joaquin Rueda, Lorena Rodrigo, Carmen Rubio, Mónica Parriego, Joan Blanco, Cristina Camprubí, Sílvia Fernández, Mireia Sandalinas, Fernando Bronet, Carles Giménez.
2.2 Curso anual precongreso ASEBIR	Joan Blanco	Esther Fernández, Mireia Sandalinas, Joan Blanco
<i>3-ASESORAMIENTO</i>		
3.1 Documentación para CNRHA	Esther Velilla	GiGR

## Listado de las reuniones establecidas

Fecha/ lugar	Actividad
14/02/2012 (Instalaciones de Espira)	Ver acta de la reunión adjunta
15/11/2012 (instalaciones CME)	Silvia Fernández, Esther Velilla, ESPIRA
Enero 2013	Se propone recoger los datos globales. Se rediseña la base de datos (Silvia Fernández y Esther Velilla)
21/01/2013	Reunión GiGR on line via "Hang out" para tratar el tema del registro (entre otros)
1/02/2013	Tras el análisis que se hizo de los datos y tras consensuarlo con el resto del Grupo, se decidió reenfoque la base de datos e intentar realizar la exportación de la base de datos de PGD Consortium. Se comunica a Espira el cambio de estrategia.
3/06/2013	Se envía por parte de ASEBIR la recogida de datos a todos los centros

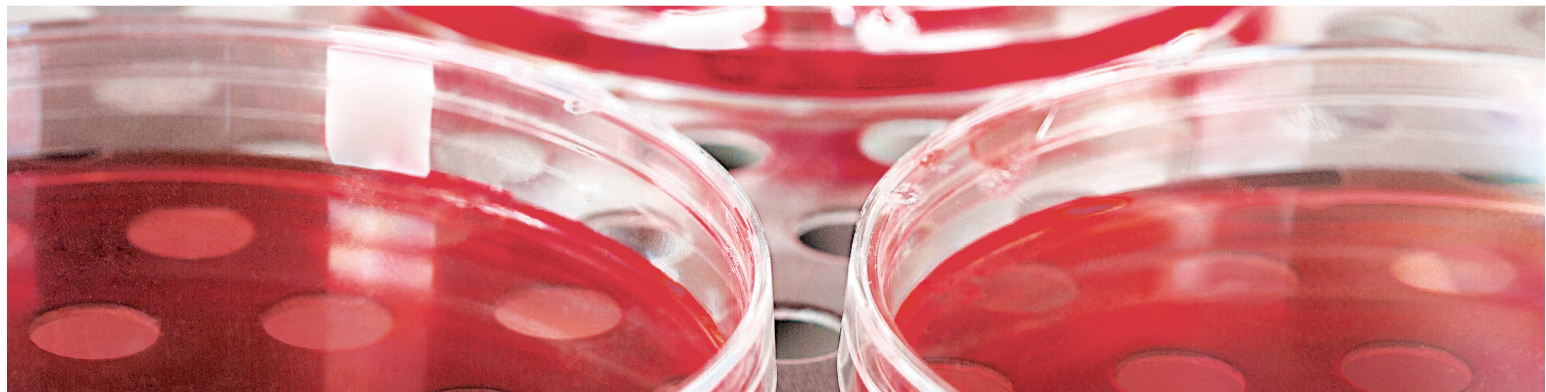
## 1.2 ELABORACIÓN DE LA PLATAFORMA DE RECOGIDA DE DATOS DE DGP ON LINE

Uno de los objetivos que nos planteamos en el congreso ASEBIR 2011 fue desarrollar una plataforma on line para la recogida de datos de DGP. Para ello realizamos una primera reunión con el grupo ESPIRA el 14 de Febrero del 2012 en las instalaciones de ESPIRA para poder definir el tipo de plataforma a utilizar.

La recogida de datos de DGP de los centros nacionales tiene tres objetivos:

1. Tener una visión global del número de DGP que se realizan en España
2. Tener una visión global de que pacientes se benefician de esta tecnología
3. Poder analizar los datos de anomalías cromosómicas y genéticas en detalle

**eppendorf**



## Incube a su manera

### Incubadores Eppendorf New Brunswick CO<sub>2</sub>

Los incubadores de CO<sub>2</sub> de Eppendorf proporcionan las condiciones ideales para un amplio rango de aplicaciones, expandiendo sus posibilidades en cultivo celular, con capacidad desde 14L hasta 170L.

- > Control de contaminación, gracias a su cámara sellada, su opción de desinfección a alta temperatura y la cámara de cobre antimicrobiana.
- > Tres opciones de control de O<sub>2</sub> para condiciones de oxigenación especiales.



[www.eppendorf.es](http://www.eppendorf.es)

Eppendorf® es una marca registrada y New Brunswick™ es una marca comercial registrada de Eppendorf AG, Alemania. Todos los derechos reservados, incluidos gráficos e imágenes. Copyright © 2013 by Eppendorf.

Una de las limitaciones que presentaba la recogida de datos era que se debía de optar por un sistema de recogida de datos que fuera fácil de realizar para todos los centros de manera que tuviéramos el máximo número de centros reportando datos.

Actualmente los centros reportan los datos específicos de DGP al PGD Consortium el cual dispone de su sistema de recogida de datos propio mediante la plataforma Filemaker. Este sistema no permitía hasta ahora exportar los datos con lo que nos planteamos en un inicio realizar la recogida de datos globales por indicación y evitar el trabajo para los centros de reportar el mismo dato a diferentes plataformas (SEF, PGD Consortium y ASEBIR). Por eso, nos centramos en desarrollar la plataforma de recogida de datos globales y en obtener datos generales del tipo de actividad que se está desarrollando en nuestro país sacrificando el poder analizar con más detalles esta información.

Así pues adaptamos los campos del registro de datos de DGP a una serie de pantallas para empezar a definir la plataforma on line y establecimos una segunda reunión con el equipo de Espira el 15 de Noviembre del 2012 para facilitarles todos los campos y que empezaran con la programación.

El 21 de Enero del 2013 realizamos una reunión on line del GiGR y acordamos rediseñar la plataforma online para poder reportar los datos ciclo a ciclo, siempre y cuando fuese factible la exportación de los datos de PGD Consortium.

Posteriormente, desde el PGD Consortium nos comunicaron que los datos pueden ser exportados de Filemaker en la nueva versión con lo que todo el proyecto cambió, ya que representó un cambio total en el diseño de pantallas y campos. Esto permitirá que los centros que reporten los datos al PGD Consortium puedan exportar dichos datos y enviarlos a la plataforma on line sin necesidad de volver a introducirlos uno a uno.

## 1.3 REGISTRO DE DATOS DGP 2010-2011

Dada la envergadura del proyecto y la complejidad de introducir tantos datos en diferentes bases de datos, decidimos recoger los datos globalmente un año más. Se decidió revisar y mejorar algunos aspectos del Excel que teníamos y enviarlo para recoger los datos del 2010 y del 2011 según los siguientes plazos:

- Lanzarlo a principios de Junio para que tengan Junio y Julio para rellenarlo.
- Trabajar los datos en Septiembre y Octubre
- Presentar los resultados de la recogida de datos en ASEBIR 2013 así como presentar oficialmente la propuesta de recogida *on line* para los datos 2012.

## 2 FORMACIÓN ON LINE

En el congreso de ASEBIR de 2011 el grupo planteó la propuesta de organizar un curso *on line* sobre las aplicaciones de la Genética en el campo de la reproducción asistida. Para la realización de esta acción formativa era necesario el desarrollo de una plataforma de formación *on line* que pudiera quedar a disposición de ASEBIR para posteriores acciones similares por este y otros grupos de interés.

### 2.1 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

La acción concreta puede dividirse en las siguientes actuaciones:

Periodo	Actividad
Finales de 2011, mayo de 2012	Definición de estructura y contenidos
Diciembre 2011- mayo 2012	Definición de profesorado
Mayo 2012	Acreditación del curso
Enero 2012-Julio 2012	Elaboración de plataforma web
Enero 2012-Julio 2012	Elaboración de contenidos por parte del profesorado
Septiembre 2012	Subida de los contenidos en la web
Mayo 2012	Publicidad del curso por parte de ASEBIR
24/9 a 23/12/2012	Inicio/finalización del curso

## 2.2 ESQUEMA GENERAL DEL CURSO

- **Título del curso:** "Curso on-line de aplicaciones de la Genética en Reproducción Asistida" (1ª Edición)
- **Objetivos del curso:** Repaso preciso de los diferentes estudios que actualmente ofrecen datos relevantes desde el punto de vista del diagnóstico, del pronóstico o del asesoramiento reproductivo. Los objetivos específicos son:

1. Profundizar en las aplicaciones de los estudios genéticos dirigidos al diagnóstico y asesoramiento genético del varón infértil/estéril.
2. Profundizar en las aplicaciones de los estudios genéticos dirigidos al diagnóstico y asesoramiento genético de la mujer infértil/estéril.
3. Conocer los estudios genéticos básicos a realizar en donantes de gametos y embriones.
4. Conocer con detalle las diferentes aproximaciones diagnósticas e indicaciones clínicas de los estudios de diagnóstico genético preimplantación.
5. Conocer los posibles efectos epigenéticos de las técnicas de reproducción asistida sobre gametos y/o embriones.

- **Temario (general):**

### TEMA 1 BASES GENÉTICAS DE LA INFERTILIDAD MASCULINA

- 1.1 Origen genético de la infertilidad masculina.
- 1.2 Causas genéticas directas.
- 1.3 Estudio de la meiosis.

- 1.4 FISH en espermatozoides.
- 1.5 Detección de mutaciones génicas mediante PCR.
- 1.6 Fragmentación del ADN espermático

## TEMA 2 BASES GENÉTICAS DE LA ESTERILIDAD/INFERTILIDAD FEMENINA

- 2.1 Causas genéticas directas.
- 2.2 Estudios genéticos en la mujer estéril/infértil.

## TEMA 3 ESTUDIOS GENÉTICOS DIRIGIDOS A LOS DONANTES DE GAMETOS Y EMBRIONES

- 3.1 Situación actual.
- 3.2 Posibles estudios genéticos.

## TEMA 4 ESTUDIOS DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIÓN (DGP)

- 4.1 Muestra de estudio (ovocitos, embriones en células y blastocistos).
- 4.2 Técnicas de biopsia, fijación y aislamiento celular.
- 4.3 EL DGP de enfermedades monogénicas.
- 4.4 EL DGP de reorganizaciones estructurales.
- 4.5 EL DGP para el screening genético preimplantación.

## TEMA 5 LA EPIGENÉTICA RELACIONADA CON LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA Y PERSPECTIVAS FUTURAS

- 5.1 La epigenética.
- 5.2 La impronta genómica.
- 5.3 La impronta genómica y la reproducción asistida.
- 5.4 Perspectivas futuras.

• **Cuerpo docente:** Joan Blanco, Fernando Bronet, Cristina Camprubí, Esther Fernández, Silvia Fernández, Carles Giménez, Monica Parriego, Lorena Rodrigo, Carmen Rubio, Joaquín Rueda, Mireia Sandalinas, Xavier Vendrell, Esther Velilla.

• **Material:**

- Plataforma *e-learning* (enlazada en la web ASEBIR)
- Manual del alumno.
- Calendario de descargas de contenidos.
- Temario.
- 17 presentaciones en formato ppt (animadas y con audio), 494 diapositivas.

- 5 Vídeos.
- 17 documentos de texto en formato pdf.
- Examen final.
- Certificado de aprovechamiento.

• **Créditos:** Curso acreditado con 7 créditos del programa de Actividades de Formación Continuada de profesiones sanitarias por la Agencia "Laín Entralgo" para la Formación, Investigación y Estudios Sanitarios de la Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid.

• **Número de alumnos:** 110 (completo)

- **Resultados:** 102 aprobados, 7 suspensos y 1 no presentado.
- **Valoración del curso:**

La plataforma permite unos análisis completos del rendimiento del curso, respuestas al examen final individualizadas por alumno y por pregunta, estadísticas de cada pregunta de la encuesta de satisfacción anonimizada por alumno y por pregunta, resultados de satisfacción por módulo, etc. Los resultados completos están en poder de la secretaría técnica de ASEBIR y del GiGR para su consulta, si se considera.

Pregunta	Respuestas				
	1	2	3	4	5
Considerando todos los aspectos, ¿cuál es la valoración global del curso?	1	2	3	4	5
	2	6	26	39	18
	2,20%	6,59%	28,57%	42,86%	19,78%
Los objetivos del curso han sido bien definidos	1	2	3	4	5
	0	10	16	40	25
	0,00%	10,99%	17,58%	43,96%	27,47%
El curso me ha proporcionado nuevos conocimientos	1	2	3	4	5
	0	7	19	32	33
	0,00%	7,69%	20,88%	35,16%	36,26%
El contenido del curso ha sido apropiado a los objetivos	1	2	3	4	5
	1	11	14	38	27
	1,10%	12,09%	15,38%	41,76%	29,67%
La metodología ha sido adecuada	1	2	3	4	5
	7	11	13	37	23
	7,69%	12,09%	14,29%	40,66%	25,27%
El contenido del curso es aplicable a mi actividad profesional	1	2	3	4	5
	0	1	16	31	43
	0,00%	1,10%	17,58%	34,07%	47,25%
Se ha cumplido el calendario previsto	1	2	3	4	5
	3	0	1	16	71
	3,30%	0,00%	1,10%	17,58%	78,02%
He seguido el curso, con la regularidad propuesta en el calendario	1	2	3	4	5
	4	15	17	27	28
	4,40%	16,48%	18,68%	29,67%	30,77%
La gestión de la Secretaría del curso ha sido ágil	1	2	3	4	5
	1	1	9	34	46
	1,10%	1,10%	9,89%	37,36%	50,55%
He tenido problemas al conectarme a la web	1	2	3	4	5
	26	7	8	21	29
	28,57%	7,69%	8,79%	23,08%	31,87%
Recomendaría la realización de este curso	1	2	3	4	5
	4	7	13	26	41
	4,40%	7,69%	14,2%	28,5%	45,0%



A continuación ofrecemos un resumen de lo que hemos considerado más relevante:

Encuestas completadas: 91  
Preguntas realizadas: 34  
Valoración del curso de 1 a 5 (1: muy mala; 5: muy buena):

Aspectos más destacados por los alumnos:

- Buena organización.
- Alto nivel de contenidos.
- Soporte docente de los power points con videos y documentos de texto en pdf.

Aspectos a mejorar:

- La calidad del audio.
- Poder realizar un examen por módulo.
- Ilustrar los temas con casos clínicos.
- Poder establecer mayor interacción con los docentes.

### 2.3 CONCLUSIONES

La valoración general del curso ha sido muy positiva. La idea del GiGR es reeditar el curso de forma bienal coincidiendo con el año en el que no hay congreso. No obstante, es importante destacar la necesidad de una revisión a fondo de la herramienta y de los recursos técnicos para poder solventar las carencias destacadas por los alumnos de la primera edición. Asimismo, es importante revisar el grado de dedicación del personal docente y el modo de compensación para próximas ediciones. La próxima edición prevista es para el curso 2014-2015.

### 3 CURSO PRECONGRESO

#### TALLER INTERACTIVO DE GENÉTICA REPRODUCTIVA (DE 9.00H A 13.30H)

Taller interactivo basado en exposiciones de temas relacionados con la genética reproductiva que afectan el día a día de los centros de reproducción asistida. Durante la sesión se analizarán casos controvertidos de actualidad. A partir de una exposición inicial por parte de un especialista se iniciará un foro de debate que pretende analizar cada tema desde diferentes puntos de vista (metodológico, clínico, ético, legal...). Finalmente se solicitará la opinión del alumnado mediante un sistema de votación. Se trata de un taller orientado a profesionales que trabajan en el campo de la reproducción asistida.

**Director del curso:** Joan Blanco

**Fecha:** 20 noviembre de 2013

**Horario:** 9.00-13.30h

1. DGP de Enfermedades genéticas (predisposición a cáncer, aparición tardía, sin indicación).  
*Esther Fernández*
2. DGP de reorganizaciones cromosómicas. Efecto intercromosómico en portadores de reordenamientos equilibrados.  
*Mireia Sandalinas*
3. Estudios en espermatozoides: FISH/ fragmentación/meiosis (variaciones intraindividuo, indicaciones).  
*Joan Blanco*

4. Estudios genéticos en donantes gametos (y embriones).  
*Esther Fernández*

Asesoría legal externa presente en los cuatro bloques: Fernando Abellán

### CONGRESO ASEBIR 2013

Se han definido las ponencias del bloque de genética del congreso ASEBIR 2013.

**Sesión de Genética y Reproducción** (Moderador: M<sup>a</sup> José Torello Ybáñez, Clínica Quirón, Barcelona)

09:00 a 09:20 hrs.

#### Estado actual del Grupo de Interés de Genética y Reproducción.

Ponente: Esther Velilla García, Institut Marques, Barcelona

09:20 a 10:00 hrs.

#### Implicaciones éticas y legales de los tests genéticos.

Ponente: Josep Santaló Pedro, UAB, Bellaterra, Barcelona

10:00 a 10:40 hrs.

#### Herramientas Bioinformáticas.

Ponente: Ivo Gut, Centro Nacional de Análisis Genómico, Barcelona

Se ha establecido la reunión de la comisión permanente del GiGR el 21 de Noviembre de 13 a 16.30h en el marco del congreso ASEBIR 2013.

## IMPLICACIONES ÉTICAS Y LEGALES DE LOS TESTS GENÉTICOS

Josep Santaló

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Facultat de Biociències. Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra. Barcelona.

[josep.santaló@uab.cat](mailto:josep.santaló@uab.cat)

### INTRODUCCIÓN

Los tests genéticos están a punto, si no lo han hecho ya, de revolucionar nuestras vidas cotidianas. La información que se obtiene de ellos cuenta con un gran interés no sólo para

nosotros sino, potencialmente, también para organizaciones y entidades que entran en contacto con nuestras vidas.

Sin embargo el potencial de los tests genéticos no se basa únicamente en disponer de dicha información, sino

que además abre la puerta a “pasar a la acción” y seleccionar e introducir cambios en las características genéticas de los individuos. Si disponer de la información genética ya significa una revolución, el seleccionar y manipular las características genéticas de nuestra

descendencia puede tener enormes consecuencias incluso en nuestro futuro como especie. Las implicaciones éticas y los preceptos legales que actualmente pretenden ordenar estas tecnologías serán objeto de esta ponencia.

## EL CONOCIMIENTO

### USO DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA

El uso de la información genética está regido por el principio de respeto a la privacidad y a la confidencialidad.

El derecho a la intimidad/privacidad es un concepto muy importante que se ha convertido en uno de los derechos humanos y está también reconocido en la Constitución Española como derecho fundamental.

Ambos conceptos están estrechamente relacionados, porque sin privacidad no puede existir la intimidad, y la intimidad en la comunicación y la relación interpersonal es necesaria para experimentar una vida plena, es decir la intimidad sin intrusiones u observaciones por parte de los otros es necesaria para tener experiencias espontáneas y no condicionadas por la vergüenza.

La confidencialidad no hace referencia a no obtener datos personales y/o sensibles del individuo, importantes para llevar a cabo la investigación o el diagnóstico, o que se deriven de ella, sino al compromiso de no desvelarlos de forma innecesaria y/o interesada. El respeto a la confidencialidad no es un derecho absoluto, ya que en determinados casos se contraviene (p.e. para denunciar actos ilegales).

Existen dos leyes que velan por el respeto a la intimidad en lo que se refiere al uso de la información genética y los datos de salud: la ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos Personales y la ley 14/2007 de Investigación Biomédica.

La amenaza que representa el uso inadecuado de la información genética se extiende desde el uso de dicha información en

- tests ocupacionales: tests genéticos que determinen la idoneidad de los candidatos en función de sus características genéticas
- el uso en las pólizas de seguros médicos: ajustando las cuotas o incluso estableciendo régimen de exclusión de prestaciones en función de las características genéticas

generando lo que podríamos considerar un tipo de “discriminación” genética. A pesar de ello, cabe remarcar que la frontera entre “selección” y “discriminación” acostumbra a ser muy tenue y difícil de precisar.

Otra de las amenazas que genera el uso de la información genética reside en la diferencia entre la certeza de desarrollar una enfermedad genética y la predisposición a presentarla. En el caso de enfermedades muy graves, sin tratamiento conocido (o con un tratamiento de eficacia incierta) y de aparición tardía surge el llamado derecho a “no saber”. El cumplimiento de este derecho puede generar dilemas éticos en el genetista que se debate entre el deber de socorro y el principio de beneficencia por una parte y el respeto a dicho derecho por la otra.

Esta circunstancia se agrava en el caso de que dicha enfermedad la puedan padecer los menores de edad. El dilema aparece porque:

- No se puede aplicar la confidencialidad ya que el resultado se comunicará a los padres
- Puede tener consecuencias en el futuro del niño a nivel personal y social por razones de estigmatización, discriminación y pérdida/baja autoestima

La raíz de todo el problema es que no se pueden aplicar decisiones autónomas a los menores, puesto que no son autónomos y, por tanto, incapaces de consentir.

Finalmente, un aspecto relacionado con el uso de la información genética se refiere a la capacidad de comprensión de esta información por parte del sujeto/paciente. La información genética y sus consecuencias acostumbran a ser

complejas para una amplia mayoría de las personas. La información proporcionada sin un asesoramiento y consejo por parte de un profesional pueden tener consecuencias imprevisibles en las vidas de los pacientes que interpretan la información que les atañe en función de juicios preformados y de las expectativas que ellos generan. A pesar de ello, dicho consejo debe estar basado en la premisa del respeto a

- la confidencialidad
- la autonomía
- no condicionamiento, transmitiendo la información de forma veraz y comprensible para el paciente

## LA ACCIÓN

Hasta aquí el uso que se haga de la información genética pero, ¿podemos ir más allá? ¿Podemos “pasar a la acción”? ¿De qué nos sirve la información si no podemos hacer nada con ella? Finalmente, ¿debemos realmente ir más allá?

Existen tres niveles de acción que pueden plantearse a partir del conocimiento de las características genéticas de los individuos, todas ellas con implicaciones éticas de calado creciente en función del nivel de intervención o cambio introducidos.

El primer nivel consiste en elegir las características genéticas deseadas, lo que podemos calificar de eugenesia.

El segundo nivel implica un cambio cualitativo de enfoque e implica modificar las características genéticas del individuo. En un primer estadio se pretende modificar caracteres considerados patológicos: la terapia génica, pero un segundo estadio va aún más allá y persigue modificar cualquier carácter con el fin de mejorar la calidad de vida del individuo: el transhumanismo.

## LA EUGENESIA

Según la Real Academia de la Lengua, la eugenesia se define como la “Aplicación de las leyes biológicas de la herencia al perfeccionamiento de la especie humana”. Sin embargo dicha definición

no tiene porqué circunscribirse exclusivamente a la especie humana puesto que otros diccionarios adoptan definiciones más generales. Así el *Oxford dictionary* considera la eugenesia como “the science of improving a population by controlled breeding to increase the occurrence of desirable heritable characteristics”.

En cuanto pronunciamos la palabra eugenesia acude a nuestra mente la imagen del nazismo, sin embargo la eugenesia tiene una curiosa historia:

- 1869: Sir Francis Galton (1822-1917) propone en su libro *Hereditari genius* el uso del control reproductivo para favorecer la aparición de los mejores individuos.
- 1907: El estado de Indiana (USA) aprueba una ley que permite la esterilización forzosa de los enfermos mentales, prisioneros y pobres. 29 estados de los USA le siguen con lo que se alcanza la cifra de más de 60.000 personas esterilizadas.
- 1927: El Tribunal Supremo de los USA dictamina la constitucionalidad de las leyes de esterilización forzosa.
- 1933: Hitler adopta las ideas eugenésicas consagrando una monstruosa forma de controlar la reproducción, a través del genocidio.
- Las ideas nazis desacreditan la eugenesia y la estigmatizan, provocando su progresiva desaparición en los USA, pero en la década de los '70 aún se sigue practicando la esterilización forzosa en algunos estados.
- El refinamiento de las tecnologías permiten la aparición de formas más sutiles de eugenesia. Entre 1980-1999 funciona el llamado *Repository for Germinal Choice*. Consistía en un banco de semen al que, supuestamente, debían acudir los laureados con el premio Nobel y que debía proporcionar “el mejor semen” a las parejas interesadas.

En la actualidad las técnicas de reproducción asistida permiten otros tipos de eugenesia. Así, la elección de donantes de gametos, ¿no convierte a los hijos en productos de un diseño deliberado?

Del mismo modo el diagnóstico genético preimplantacional (PGD) (y el prenatal), ¿no pueden ser considerados una forma de eugenesia?

A la respuesta probablemente afirmativa debe hacerse una matización. Algunos autores (Agar N., 2004) califican esta eugenesia como una eugenesia “liberal”. Una eugenesia que se diferencia de la eugenesia clásica en que se ejerce individualmente y no de forma dirigida o centralizada y que, por tanto, no tiene un único objetivo, un único patrón, al cual toda la población debe de tender obligatoriamente. Consecuentemente, se trata de una eugenesia voluntaria, no obligada y que respeta el principio de autonomía de las personas.

Esta eugenesia liberal, para ser auténtica, exige el respeto a la autonomía de los individuos seleccionados proporcionándoles un futuro abierto, no condicionado por sus capacidades seleccionadas.

De todas formas, no está exenta de riesgos ya que, si bien es claro que no es un movimiento de reforma social, si puede ser una forma para que los padres más privilegiados tengan los hijos que desean y los preparen para el éxito en una sociedad altamente competitiva.

La segunda crítica que se realiza al PGD es la de la instrumentalización de los hijos, especialmente si se trata de un ciclo cuya indicación es el *HLA matching*. Esta crítica proviene del respeto al imperativo categórico Kantiano (Kant I., 1785) en el que se afirma: “... el ser humano, y en general cualquier ser racional, existe como un fin en sí mismo, no como un simple instrumento para ser utilizado únicamente con esta o aquella finalidad a placer”. Es verdad que, en cierto sentido, los hermanos donantes compatibles han sido generados para satisfacer una necesidad, han sido instrumentalizados, pero la clave del respeto Kantiano reside en la palabra “ÚNICAMENTE”. Esta afirmación viene sustentada por el hecho de que dichos hermanos cuando ya han actuado como donantes o bien si se da la circunstancia de que receptor ha fallecido y dejan de “ser útiles”, los padres no los abandonan, ni los ceden en adopción,

muestra clara que su amor por ellos va más allá de su “valor” como donantes compatibles de los hermanos enfermos.

Por otro lado la instrumentalización de los hijos es, de hecho, una práctica bastante común (por ejemplo, los niños en parte concebidos para heredar una fortuna, o continuar una monarquía constitucional o simplemente para resolver los problemas de relación entre los miembros de la pareja) en el caso que nos ocupa, salvar una vida ya existente (compatibilidad HLA) ¿no puede ser considerada una “buena razón” para instrumentalizar parcialmente un niño?

Finalmente, la eugenesia puede hacer también un salto cualitativo e ir más allá en la selección de caracteres no patológicos por razones meramente sociales (p.e. en el caso del *social sexing*). Pero de esto hablaremos con mayor detenimiento más adelante (transhumanismo).

La principal regulación legal que existe sobre la selección de los hijos se encuentra en la ley 14/2006 de Técnicas de Reproducción Asistida en su artículo 12 que regula las circunstancias en que puede llevarse a cabo el PGD.

## LA TERAPIA GÉNICA

La cuestión que surge inmediatamente es la siguiente: ¿Es éticamente aceptable modificar genéticamente un embrión para producir un “nuevo individuo”?

Está claro que el genoma está en la base biológica de la identidad de los individuos, sin embargo no somos sólo genética. Así Peter Kemp (Rendtorff J.D. y Kemp P., 2000) propone “La integridad genética del embrión es la base de su propia identidad, es una condición necesaria, pero no suficiente, para la identidad personal”.

Por otro lado, desde una óptica utilitarista, la respuesta a esta pregunta puede depender del alcance de esta modificación. Así, la modificación genética puede tener dos objetivos

cuyas fronteras son especialmente difusas:

- Modificar las características patológicas: terapia génica
- Modificar algunos caracteres y/o capacidades del ser humano: mejora biológica, transhumanismo

En general, la terapia génica está más ampliamente aceptada puesto que persigue recuperar el equilibrio que la enfermedad altera. Ello es especialmente cierto cuando nos referimos a la terapia génica en adultos, sin embargo la modificación de caracteres que pueden ser heredados (modificación gonadal o terapia génica embrionaria) suscita mayores recelos puesto que incluso podría llegar a generar procesos de especiación dentro de nuestra propia especie.

## EL TRANSHUMANISMO

Cuando la modificación genética no sólo persigue cambiar caracteres patológicos, si no que va más allá y pretende incrementar las posibilidades de la gente de llevar una vida mejor entramos en el terreno de la mejora biológica de la especie humana.

Tradicionalmente la mejora de la calidad de vida de los individuos mediante el refinamiento de sus capacidades intelectuales y físicas se ha perseguido mediante la educación y el entrenamiento físico. Sin embargo esta actividad, *a priori* encomiable no está exenta de un "lado oscuro": el hiperpaternalismo. Los padres apostando por incrementar a cualquier precio las capacidades innatas supuestamente descubiertas en sus hijos son una situación que deviene más frecuente a medida que nuestra sociedad se torna más y más competitiva.

Frente a esta situación se plantea la posibilidad de modificar genéticamente los individuos para conseguir de una forma más fácil y segura los mismos objetivos.

Recientes modificaciones genéticas en animales (Hakimi P. et al., 2007)

apuntan a la posibilidad de conseguir capacidades físicas insospechadas en los individuos modificados genéticamente. Las capacidades intelectuales podrían seguir las en breve.

En este sentido, Peter Sloterdijk (2000) propone contrarrestar las fuerzas envilecedoras del hombre "...mediante una antropotecnica orientada a la planificación explícita de las características... extender por todo el género humano el paso del fatalismo natal al nacimiento opcional y a la selección prenatal." Esta propuesta se denomina generalmente transhumanismo y forma parte de la corriente del tecnoprogresivismo.

Según algunos autores (Savulescu J., 2007), ésta no es solo una opción si no un deber moral basado en el deber de socorro y el principio de beneficencia: "La mejora biológica para incrementar las oportunidades es ética. Si tenemos la obligación de tratar y prevenir las enfermedades, tenemos la obligación de tratar de manipular estas características para ofrecer al individuo la mejor oportunidad de una vida mejor". Esta corriente de pensamiento está basada en considerar que el incremento del bienestar de las personas es equivalente a un tratamiento médico puesto que la salud no es sólo la ausencia de dolor, si no conseguir el máximo bienestar para la persona.

En este caso la alteración substantiva de las capacidades intelectuales y mentales del individuo, ¿supondría una alteración de la identidad individual? ¿Podríamos considerar esta práctica como una modalidad de "asesinato" haciendo desaparecer una persona para hacer aparecer otra?

En contra del transhumanismo se alzan voces (Sandel M., 2009) que consideran que el diseño de los hijos "...manifiesta y promueve una cierta actitud de control y dominio que no reconoce el carácter de "don" de las capacidades y logros humanos y olvida que la libertad consiste en una negociación permanente con aquello que se recibe."

Según Michel Sandel el diseño de los hijos modifica 3 conceptos básicos:

- La humildad: El no poder escoger a nuestros hijos nos enseña a mantenernos abiertos a aquello que se recibe y aceptarlo.
- La responsabilidad: El diseño implica una elección, y dicha elección debe ser la adecuada; ello nos convierte en responsables de la elección.
- La solidaridad: Si nuestra dotación genética es un "don" tenemos la obligación de compartir los beneficios que ella reporta con los que no tienen el mismo don, pero que no son responsables de sus limitaciones.

Como respuesta a lo comentado, la normativa internacional y la legislación española ponen límites a la modificación genética. Así el Art. 13 del Convenio de Oviedo (1997) propone: Cualquier intervención encaminada a modificar el genoma humano sólo puede ser llevada a cabo con propósitos preventivos, diagnósticos o terapéuticos y sólo si su objetivo no es introducir modificaciones en el genoma de la descendencia. Dicha propuesta tiene su transposición casi literal en la ley 14/2007 de Investigación Biomédica.

Sin embargo, en la legislación española surge una evidente contradicción al respecto cuando en la ley 14/2006 de Técnicas de reproducción asistida se autoriza en su Art. 13 las técnicas terapéuticas en el embrión siempre que "no se modifiquen los caracteres hereditarios no patológicos ni se busque la selección de los individuos o de la raza". Pero una modificación embrionaria de este tipo, ¿no implica indefectiblemente "la introducción de una modificación en el genoma de la descendencia" considerado en la ley 14/2007 (Art.74) como una infracción grave y prohibido por el Convenio de Oviedo?

En el fondo lo que importa no es como hagamos el camino, ya sea a través de la educación y/o el entrenamiento, ya sea a través de la mejora genética, la



cuestión es si se desprecia la libertad de los hijos para escoger su propia vida.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agar N. 2004. *Liberal Eugenics, In Defence of Human Enhancement*. Blackwell. Oxford. UK

European Council. 1997. *Convention on Human Rights and Biomedicine*. Oviedo.

Hakimi P., Yang J., Casadesus G. et al. 2007. Overexpression of the Cytosolic Form of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase

(GTP) in Skeletal Muscle Repatterns Energy Metabolism in the Mouse. *Journal Biological Chemistry*: 282, 32844–32855.

Kant E. 1785. *Grundlegung zur Metaphysik der Sitten*. Groundwork for the metaphysics of morals. 2002. tr. Arnulf Zweig. Thomas E. H., Jr. and Zweig A. (eds.). Oxford University Press. Oxford. UK.

Rendtorff J.D. y Kemp P. (eds.) 2000. *Basic ethical principles in European Bioethics and Biolaw*. Institut Borja de Bioètica. Barcelona.

Sandel M. 2009. *The case against perfection: Ethics in the age of genetic engineering*. Belknap Press of Harvard University Press. Boston. USA.

Savulescu J. 2007. Genetic interventions and the Ethics of Enhancement of Human Beings. In Steinbock B. (ed.). *The Oxford Handbook of Bioethics*. Oxford University Press. Oxford. pp 516-533.

Sloterdijk P. 2000. *Normas para el parque humano: una respuesta a la Carta sobre el humanismo de Heidegger*. tr. Teresa Rocha Barco. Siruela. Madrid.

## DATA ANALYSIS OF NEXT GENERATION NUCLEIC ACID SEQUENCING

Ivo Glynne Gut, PhD

Centro Nacional de Análisis Genómico, Barcelona, Spain

Next generation sequencing opens an unprecedented host of analytical possibilities. Applications are in DNA analysis for genetic investigations and cancer genomic characterisations, for RNA sequence analysis (miRNA, mRNA,...) and for epigenomic measurements of DNA/protein interactions and DNA modification analysis (e.g. 5mC). Species analysed by NGS span everything imaginable from viruses to human. Even sequencing of microbial populations jointly has been demonstrated. The main characteristic of the current generation of sequencers is that they

provide a huge number (billions) of short reads (50-300 bp). Extracting useful information out of these sequences requires sophisticated computational approaches. The amount of data that needs to be handled for a single experiment requires particular computational expertise. The analytical approaches depend largely on the question that is to be answered. All bioinformatic procedures combine the same fundamental elements: 1) Translation of signals into basecalls, 2) joining basecalls to individual sequences, 3) if a genome reference sequence exists,

individual sequences are aligned to it, otherwise the sequences need to be assembled, 4) calling differences to a reference, and 5) predicting what the impact of variants on a biological system might be. As in most instances slight deviations from a reference are of interest, the alignment strategies need to tolerate these deviations. In this presentation the bioinformatic concepts of large-scale nucleic acid sequence analysis will be discussed together with issues that will need to be resolved for the deployment of this form of sequencing for clinical applications.



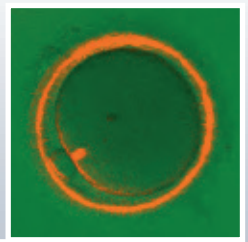
Alarma



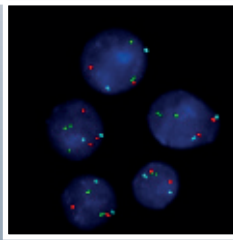
Time-lapse



Polarización



IMSI



FISH



Biopsia TFE

# Think Quality

## ■ Herramientas de precisión

Sistemas de microscopía para observación y micromanipulación

## ■ Control permanente de parámetros

Condiciones de cultivo estables en un entorno controlado

## ■ Selección de los mejores candidatos

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

## ■ Mejores decisiones

Haga un mejor análisis teniendo toda la información

# OLYMPUS

Your Vision, Our Future

Olympus Iberia S.A.U • [informacion.micro@olympus.es](mailto:informacion.micro@olympus.es) • [www.olympus.es](http://www.olympus.es)

## ASPECTOS RELEVANTES DE LA SALUD DE LOS EMBRIÓLOGOS CLÍNICOS

Pilar Jimena<sup>1</sup>, Silvia Carrillo<sup>2</sup>, María del Carmen Gonzalvo<sup>2</sup>, Ana Clavero<sup>2</sup>, María Luisa López-Regalado<sup>2</sup>, María Serrano<sup>2</sup>, Blanca López<sup>2</sup>, Inmaculada Orozco<sup>2</sup>, Alicia Mantilla<sup>2</sup>, Marina Rodríguez<sup>2</sup> y José Antonio Castilla<sup>2,3,4</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Salud de Alfacar, Granada. <sup>2</sup>Unidad de Reproducción, UGC Obstetricia y ginecología, Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (IIBG), Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada. <sup>3</sup>Banco de Semen, CEIFER, Granada. <sup>4</sup>MasVida Reproducción, Sevilla. [pjiimo@gmail.com](mailto:pjiimo@gmail.com)

Los embriólogos clínicos son profesionales del laboratorio clínico, que desempeñan una parte esencial en el diagnóstico y tratamiento de la esterilidad, prevención de la transmisión de enfermedades genéticas e infecciosas y en la preservación de la fertilidad. Al contrario que en otros laboratorios clínicos, el laboratorio de embriología está poco automatizado y precisa de numerosas técnicas manuales. Este trabajo está asociado con cansancio físico debido a períodos largos en el microscopio y trabajo de ordenador. Existiendo riesgos potenciales para la salud como pueden ser el manejo de material biológico reproductivo de pacientes con enfermedades infecciosas o el manejo de nitrógeno líquido. Además el alto grado de atención que debe mantener el embriólogo con el fin de evitar errores de graves consecuencias en la manipulación de muestras provoca con frecuencia cansancio mental. Otros factores que agravan este cansancio son el elevado trabajo de oficina que requieren los sistemas de calidad y trazabilidad, y los inevitables picos de trabajo existentes en el laboratorio de embriología.

El personal que trabaja en condiciones de estrés con el tiempo padece ansiedad, cansancio y monotonía lo que le lleva a inseguridad en su trabajo. Los trabajadores hacen frente a estas preocupaciones mediante el uso de defensas psicológicas que tienen un impacto importante en las relaciones interpersonales y el desempeño laboral. Actualmente, entre los problemas relacionados con el trabajo se encuentra el Síndrome del Quemado en el Trabajo (SQT), con consecuencias negativas tanto para las personas que lo padecen, como para los centros en los cuales trabajan (Maslach and Jackson, 1981; Schwab et al., 1993)

Según la definición más utilizada propuesta por Maslach et al. (2001),

este síndrome incluye las dimensiones de agotamiento emocional, cinismo e ineficacia profesional, y es el resultado de la exposición prolongada al estrés crónico en el trabajo. Este síndrome puede afectar la salud física y/o mental de una persona, dando lugar a trastornos psicósomáticos (dolores de cabeza, insomnio, úlceras, gastritis,..) o trastornos psicopatológicos (depresión, ansiedad, obsesión-compulsión) (Balch et al., 2009). Para

las organizaciones, esto puede conducir a una seria reducción en el rendimiento, rotación de personal y aumento del absentismo laboral.

Existen numerosos estudios sobre la salud mental y física de profesionales sanitarios en general, oscilando la prevalencia de SQT entre 4 y 40%. No obstante, son escasos los estudios en profesionales del laboratorio clínico (Fritzsche et al., 2012)

Tabla I.- Variables sociodemográficas y salud física (PCS-12) y mental (MCS-12).

DATOS SOCIODEMOGRÁFICOS	N (%)	PCS-12	MCS-12
<b>EDAD</b>			
Tercil inferior ≤33	86 (34.68%)	54.05±6.39 (35.86;67.59)	42.49±9.66 (16.29;56.01)
Tercil intermedio 34-39	83 (33.47%)	54.25±5.77 (37.06;65.95)	42.66±11.37 (14.10;58.83)
Tercil superior ≥40	79 (31.85)	54.02±6.01 (30.66;65.92)	43.94±12.05 (17.09;59.19)
<b>PAREJA ESTABLE</b>			
No	48 (20.0%)	54.18±5.84 (35.86;64.09)	42.42±9.90 (21.25;56.38)
Sí	192 (80.0%)	54.09±6.10 (37.66;67.59)	43.15±11.28 (14.10;59.19)
<b>HIJOS</b>			
No	118 (49.16%)	54.05±5.87 (35.86;65.75)	42.51±10.16 (14.10;56.38)
Sí	122 (50.83%)	54.16±6.23 (30.66;67.59)	43.48±11.78 (17.09;59.19)
<b>SEXO</b>			
Hombre	53 (22.08%)	53.43±6.47 (30.66;64.09)	45.39±11.28 (16.29;59.19)
Mujer	187 (77.91%)	54.30±5.92 (35.86;67.59)	42.33±10.86 (14.10;58.83)
<b>ÍNDICE DE MASA CORPORAL</b>			
Normal <25	189 (77.14%)	54.82±5.71 (38.73;67.59)	42.36±10.88 (16.29;58.83)
Sobrepeso 25-29	52 (21.22%)	51.82±6.84 <sup>a</sup> (30.66;63.19)	45.14±11.33 (14.10;58.83)
Obesidad ≥30	4 (1.63%)	51.01±4.34 (47.67;56.98)	47.11±10.79 (33.34;59.19)

<sup>a</sup> Sobrepeso vs Normal  $p < 0.05$

no existiendo en la actualidad ningún estudio que analice estos aspectos en embriólogos clínicos. En este estudio, evaluamos el estado de salud física y mental y su relación con diferentes características ocupacionales y el SQT en embriólogos clínicos españoles.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio transversal mediante encuestas online completadas por los participantes.

### PARTICIPANTES

La población del estudio consistió en todos los embriólogos miembros de la asociación española de embriología clínica (Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción; ASEBIR), que habían estado trabajando continuamente durante los últimos nueve meses. Entre mayo y junio de 2013 dos e-mail se enviaron a todos los miembros de ASEBIR (787) que explicaban los objetivos de la investigación. Estos emails contienen un enlace al cuestionario on-line y el consentimiento informado. Para la estimación de la proporción de SQT con una precisión de 4%, con un nivel de confianza del 95% y asumiendo una prevalencia del 10% (Fritzsche et al., 2012), se requerían 217 personas.

### INSTRUMENTOS

El cuestionario comprende preguntas sociodemográficas y ocupacionales y dos instrumentos estándares: "Short Form-12 Health Survey (SF-12)" como una medida de salud física y mental (Ware et al., 1996) y "Maslach Burnout Inventory—General Survey (MBI-GS)" (Schaufeli et al., 1996), en su versión en español validada (Salanova et al., 2000) para evaluar el grado de SQT.

### MEDIDAS

### CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS Y OCUPACIONALES

Se les pidió primero a los sujetos que completaran una serie de preguntas específicamente relacionadas con datos sociodemográficos: edad, sexo, relación

estable e hijos. En segundo lugar, el cuestionario recoge información sobre las características del trabajo y la carga de trabajo: Trabajo de embriólogo en los últimos nueve meses (sí vs no), tipo de centro (público vs privado), el número de horas trabajadas por semana, tiempo trabajado, el tipo de contrato (fijo vs tipo de contrato temporal) (tiempo completo vs tiempo parcial) y personas en el laboratorio. A los participantes se les preguntó en el cuestionario su propia visión del futuro en el trabajo como embriólogos. ¿Usted cree que va a ser

capaz de hacer su trabajo actual cuando tenga 60 años? "Yo, no quiero", "No, yo creo que no?" o "Sí, creo que sí".

Para evaluar las medidas de seguridad laboral, preguntamos sobre: uso de guantes durante el manejo del semen y el líquido folicular, y el uso de medidas de protección durante el manejo del nitrógeno líquido. Las respuestas a estas preguntas fueron clasificadas utilizando escalas Likert de seis puntos que van desde "Siempre" a "nunca". Además se evalúa el estado vacunal frente al

Tabla II. - Variables sobre condiciones de trabajo y salud física (PCS-12) y mental (MCS-12).

CONDICIONES DE TRABAJO	N (%)	PCS-12	MCS-12
<b>TIPO DE CENTRO</b>			
Privado	186 (77.82%)	54.23±5.76 (35.86;67.59)	42.64±10.88 (14.10;59.19)
Público	53 (22.17%)	53.95±6.77 (30.66;65.92)	44.60±11.25 (17.09;58.83)
<b>TIPO DE CONTRATO</b>			
Fijo	190 (80.16%)	54.17±6.22 (30.66;67.59)	42.77±11.22 (14.10;58.83)
Otro tipo de contrato	47 (19.83%)	54.36±4.99 (41.06;61.32)	44.75±9.86 (22.85;59.19)
<b>TIEMPO PARCIAL O COMPLETO</b>			
Completo	213 (89.49%)	54.00±6.11 (30.66;65.95)	42.96±11.09 (14.10;59.19)
Parcial	25 (10.50%)	54.65±5.56 (38.73;67.59)	43.71±10.57 (20.12;58.83)
<b>TIEMPO TRABAJANDO</b>			
≤10 años	162 (67.5%)	54.13±6.33 (38.73;67.59)	42.44±10.88 (16.29;58.83)
>10 años	78 (32.5%)	54.08±5.73 (30.66;64.09)	43.61±11.15 (14.10;59.19)
<b>PERSONAS TRABAJANDO</b>			
1-2 personas	77 (32.21%)	54.95±5.00 (38.73;67.92)	43.73±9.61 (14.10;58.83)
3-4 personas	62 (25.94%)	53.20±6.22 (35.86;65.95)	41.95±11.64 (16.29;58.83)
≥ 5 personas	100 (41.84%)	54.02±6.63 (30.66;67.59)	43.11±11.69 (17.09;59.19)
<b>HORAS/SEMANA</b>			
<35	38 (15.89%)	55.17±4.94 (39.83;67.59)	42.86±11.71 (17.87;58.83)
35-45	161 (67.36%)	54.52±5.65 (37.06;65.95)	43.07±10.87 (14.10;59.19)
>45	40 (16.73%)	51.45±7.80 <sup>a</sup> (30.66;63.57)	42.88±11.24 (16.29;57.43)
<b>LUZ SUFICIENTE</b>			
No	114 (47.50%)	53.28±6.98 (30.66;67.59)	40.96±11.51 (16.29;58.45)
Sí	126 (52.50%)	54.86±4.95 <sup>b</sup> (39.41;65.95)	44.85±10.22 <sup>c</sup> (14.10;59.19)



TEMPERATURA ADECUADA			
No	85 (35.56%)	53.65±6.36 (35.86;67.59)	40.38±11.51 (14.10;57.67)
Sí	154 (64.43%)	54.32±5.86 (30.66;65.95)	44.54±10.29 <sup>d</sup> (17.09;59.19)
RUIDO SOPORTABLE			
No	56 (23.33%)	52.00±7.42 (30.66;67.59)	40.76±12.62 (17.09;57.67)
Sí	184 (76.66%)	54.75±5.42 <sup>e</sup> (38.15;65.95)	43.69±10.40 (14.10;59.19)
VENTILACIÓN SUFICIENTE			
No	75 (31.64%)	54.00±6.47 (35.86;67.59)	40.70±11.64 <sup>f</sup> (14.10;58.83)
Sí	162 (68.35%)	54.07±5.87 (30.66;65.92)	44.08±10.58 (16.29;59.19)
TRABAJO CÓMODO			
No	74 (30.96%)	52.67±7.67 (30.66;67.59)	40.75±11.72 (14.10;57.67)
Sí	165 (69.03%)	54.79±5.04 (38.73;65.95)	43.97±10.57 (16.29;59.19)
REALIZAR EL MISMO TRABAJO A LOS 60 AÑOS			
No, no lo creo	119 (49.79%)	53.46±6.78 (30.66;67.59)	41.29±11.00 (16.29;57.67)
No, no quisiera	34 (14.22%)	53.07±6.07 (37.06;61.54)	42.16±11.61 (14.10;58.83)
Sí, lo creo	86 (35.98%)	55.37±4.66 (38.73;65.92)	45.09±10.62 (21.25;59.19)

<sup>a</sup> >45 vs <35 p<0.05; <sup>b</sup> >45 vs 35-45 p<0.05, <sup>c</sup> p<0.05, <sup>d</sup> p<0.01, <sup>e</sup> p<0.01, <sup>f</sup> p<0.05

virus de hepatitis B y el virus de gripe, y si su centro le ha facilitado formación sobre riegos y normas de seguridad del laboratorio y ("sí" vs "no").

Las condiciones relacionadas con el trabajo se evaluaron mediante cinco preguntas ("sí" vs "no") Sobre la idoneidad de las condiciones ergonómicas del puesto de trabajo: comodidad, luz, temperatura, ruido y ventilación. Por último se preguntó sobre si se había sufrido algún accidente laboral en los dos últimos años.

## SALUD FÍSICA Y MENTAL

El SF-12 es un cuestionario corto desarrollado a partir de la Encuesta de Salud SF-36 original. El SF-36 comprende ocho escalas (funcionamiento físico, limitaciones de rol por problemas de salud física y emocional, dolor físico, percepción de salud general, vitalidad, función social, y salud mental). SF-12 está comprendido de uno o dos elementos de cada una de las ocho escalas originales. El estado de salud física y mental se calcula con algoritmos

de puntuación para todos los elementos. Para mantener la comparabilidad nacional, los pesos se calculan de acuerdo a la norma de referencia española (Vilagut et al., 2008). Calculándose los Componentes Sumatorios Físico (PCS-12) y Mental (MCS-12) del SF-12. Las puntuaciones agregadas PCS-12 y MCS-12 se estandarizan para obtener una media de 50 y una desviación estándar de 10 en la población general española. De esta forma, valores superiores o inferiores a 50 se interpretan como mejores o peores, respectivamente, que los de la población en general española.

Además del índice de masa corporal (IMC) se evaluaron otros aspectos de la salud física. Presencia de molestias achacadas a posturas o esfuerzos realizados en su trabajo en el último año: molestias oculares ("no" frente a "sí"), pérdida de agudeza visual ("no" frente a "sí"), dolores de cabeza, dolor de cuello, dolor de espalda, miembros superiores e inferiores. Las respuestas a estos últimos 5 ítems fueron evaluados mediante escalas Likert de seis puntos que van desde "Siempre" a "Nunca".

## MBI-GS

Consta de 15 ítems agrupados en tres dimensiones o subescalas: ' agotamiento emocional ', ' cinismo ' y ' eficacia profesional '. Las respuestas se organizan en una escala tipo Likert de 7 opciones de respuesta, que se calificó de 0 ("nunca") a 6 ("siempre") . La dimensión "agotamiento emocional" se compone de 5 elementos (por ejemplo, "Me siento emocionalmente agotado por mi trabajo"), la dimensión "cinismo" se compone de 4 elementos (por ejemplo, "Me he vuelto más insensible hacia la gente desde que comencé este trabajo") y dimensión de la "eficacia profesional" se compone de 5 elementos (por ejemplo, " Soy capaz de resolver eficazmente los problemas que surjan de mi trabajo"). La puntuación total de cada subescala se calcula sumando las puntuaciones de cada ítem, dividido por el número de ítem en esta subescala. Los casos de SQT se definieron según puntos de corte basados en un marco de referencia normativo estandarizado (Manual Español MBI-GS; Bresó et al, 2013): una puntuación mayor o igual que el percentil 75 en el agotamiento emocional (2,9) o en el cinismo (2,26) o una puntuación menor o igual que el percentil 25 en la eficacia profesional (3,83).

Tanto la validez factorial del MBI-GS y la consistencia interna de las dimensiones que lo componen fueron adecuados (Gil-Monte, 2002). Un análisis de los factores explicativos utilizando análisis de componentes principales con rotación varimax identificó tres dimensiones de SQT. La solución de los tres factores contenía unas cargas cruzadas y capturó el 64% de la variación total en las respuestas de los embriólogos. El primer factor se interpretó como la dimensión "agotamiento emocional" ( $\alpha$  de Cronbach = 0,86), el segundo como el "cinismo" ( $\alpha$  de Cronbach = 0,88) y el tercero como la dimensión "eficacia profesional" ( $\alpha$  de Cronbach = 0,82). Las subescalas sólo se correlacionan moderadamente una con la otra (Rango del coeficiente de Pearson -0,20 a 0,59).

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se presenta la estadística descriptiva de los PCS-12 y MCS-12 utilizando

medias, desviaciones estándar, máximos y mínimos a través de los niveles de las variables categóricas y terciles de variables cuantitativas, incluidas las tres subescalas MBI-GS. Excepto IMC que se dividió según tres clases: <25 Kg/m<sup>2</sup>, 25-29 y ≥ 30 Kg/m<sup>2</sup>. El test de t de Student y el análisis de la varianza se utilizaron para comparar las medias entre los diferentes grupos. El coeficiente de correlación de Pearson se utilizó también para

estudiar las correlaciones entre las puntuaciones PCS-12 y MCS-12 y las subescalas MBI. La media obtenida en los PCS-12 y MCS-12 de la muestra de embriólogos se compararon con las muestras de referencia españolas en función del género en adultos (35-44 años) (Vilagut et al., 2008) utilizando la prueba t de Student de dos colas. Las diferencias en las variables categóricas se evaluaron utilizando la prueba de chi-cuadrado.

Tabla III.- Variables sobre seguridad laboral y salud física (PCS-12) y mental (MCS-12).

SEGURIDAD	N (%)	PCS-12	MCS-12
<b>USO DE GUANTES EN SEMEN</b>			
Siempre-Casi siempre	183 (76.25%)	54.21±5.56 (35.86;67.59)	43.57±10.73 (14.10;59.19)
Muchas veces-Algunas veces	30 (12.5%)	52.49±7.51 (38.73;65.92)	41.37±11.10 (18.45;56.38)
Solo algunas veces-Nunca	27 (11.25%)	55.21±7.18 (30.66;65.95)	40.98±12.61 (17.09;58.45)
<b>USO DE GUANTES EN LÍQUIDO FOLICULAR</b>			
Siempre-Casi siempre	177 (74.36%)	54.51±5.65 (37.06;67.59)	43.64±10.32 (16.29;59.19)
Muchas veces-Algunas veces	14 (5.88%)	50.96±5.63 (40.58;57.94)	41.42±13.76 (14.10;56.01)
Solo algunas veces-Nunca	47 (19.74%)	53.58±7.36 (30.66;65.92)	40.74±12.53 (17.09;58.45)
<b>PROTECCIÓN PARA NITRÓGENO LÍQUIDO</b>			
Siempre-Casi siempre	99 (41.25%)	54.24±5.81 (30.66;65.92)	43.48±10.89 (16.29;58.83)
Muchas veces-Algunas veces	69 (28.75%)	54.55±5.64 (40.58;64.09)	43.12±10.80 (14.10;58.45)
Solo algunas veces-Nunca	72 (30%)	53.51±6.73 (35.86;67.59)	42.24±11.44 (20.12;59.19)
<b>VACUNA VHB</b>			
No	24 (10.12%)	55.78±6.57 (39.83;65.92)	39.58±11.78 (22.85;57.67)
Sí	213 (89.87%)	53.87±5.99 (30.66;67.59)	43.56±10.83 (14.10;59.19)
<b>VACUNA GRIPE</b>			
No	215 (89.95%)	54.29±5.64 (38.15;67.59)	43.59±10.49 (14.10;59.19)
Sí	24 (10.04%)	53.21±8.21 (30.66;65.92)	38.58±13.89 <sup>a</sup> (17.09;57.34)
<b>FORMACIÓN SOBRE MEDIDAS PREVENTIVAS</b>			
No	101 (42.08%)	53.31±6.78 (30.66;65.95)	41.29±11.52 (14.10;57.34)
Sí	119 (49.58%)	54.77±5.09 (37.06;65.75)	44.90±10.21 <sup>b</sup> (16.29;59.19)
No sabe	20 (8.33%)	54.21±7.07 (35.86;67.59)	40.36±11.48 (20.12;58.83)

<sup>a</sup> p<0.05, <sup>b</sup> No vs Sí p<0.05

## RESULTADOS

### PARTICIPANTES

La tasa de respuesta después de dos recordatorios fue del 34,7 % (254/731). Se excluyeron 10 cuestionarios, ya que no habían trabajado los últimos 9 meses y 4 porque no habían contestado el 50% de la encuesta, resultando válidas 240 cuestionarios (Figura 1). La edad media fue de 38 años y el 77,9 % fueron mujeres. La mayoría de los participantes tenían pareja estable (80,0%), teniendo más de la mitad hijos (50,8%). Respecto a las características laborales, la mayoría trabaja en centro privado (77,8%) con un contrato fijo (80,2%) a tiempo completo entre 35-45 horas semanales, el 67,5% había trabajado como embriólogo menos de 10 años y la mayoría (41,8%) trabaja con más de 5 embriólogos en el laboratorio. No hubo diferencias entre los sexos (22,1% hombres vs 26,9% hombres) y el tipo de centro (22,2% trabaja en un centro público frente al 23,4%) entre los participantes y el total de socios en ASEBIR, respectivamente.

En cuanto, medidas de seguridad más de 10% y un 20% de los embriólogos contestaron no usar guantes nunca o solo algunas veces al manejar el semen o el líquido folicular, respectivamente. Y un alarmante casi 30% no utilizaba nunca o solo algunas veces protección al manipular nitrógeno líquido. El 10% no estaban vacunados frente a la hepatitis B y el 90,0% frente a la gripe. Un 42% de los embriólogos no ha recibido formación sobre medidas de seguridad laboral en su puesto.

Respecto a las condiciones de trabajo entre un 23,3% y un 47,5%, considera que su puesto de trabajo no es cómodo, no está suficientemente iluminado, no tiene una temperatura adecuada para trabajar, hay demasiado ruido o esta escasamente ventilado.

Los problemas musculoesqueléticos afectan a más del 90% del embriólogo español. Las molestias más comunes fueron brazos (94,9%), seguido de espalda (76,7%) y cuello (70,6%). Alrededor del 45% refiere frecuentes dolores de cabeza. La prevalencia de problemas visuales fue del 46% habiendo perdido agudeza

visual en el último año el 55,6% de embriólogos. Quince embriólogos (6,2%) tuvieron al menos una lesión durante los dos últimos años. Solo el 35,9% de los embriólogos cree que estará realizando el mismo trabajo a los 60 años de edad. Este porcentaje es inferior al porcentaje observado en una población española de referencia de trabajadores de la misma edad (47,4%) ( $p < 0,01$ ).

La puntuación de estado físico de los embriólogos españoles fue superior a la de una población de referencia ( $54,1 \pm 6,0$  vs  $52,6 \pm 0,2$ ,  $p < 0,001$ ). La puntuación de estado físico de los embriólogos españoles que proporcionaron datos fue similar en varones ( $53,4 \pm 6,5$  vs  $53,2 \pm 0,4$ ) y significativamente mayor en las mujeres en comparación con un grupo de referencia de adultos ( $54,3 \pm 5,9$  vs  $52,1 \pm 0,3$ ,  $p < 0,001$ ). Sin embargo, las puntuaciones de salud mental en total ( $43,0 \pm 11,0$  vs  $50,6 \pm 0,2$ ,  $p < 0,001$ ) y en ambos sexos (hombres:  $45,4 \pm 11,3$  vs  $51,8 \pm 0,2$ ,  $p < 0,001$ ; mujeres:  $42,3 \pm 10,7$  vs  $49,5 \pm 0,3$ ;  $p < 0,001$ ) fueron significativamente más bajas. La prevalencia de los niveles altos de cada una de las subescalas del MBI-GS, fue de 20% en la dimensión "agotamiento emocional", el 15,4% en "cinismo" y el 10,8% en la dimensión de "eficacia profesional". Las medias de PCS-12 y MCS-12 en embriólogos con alto agotamiento emocional fue  $52,4 \pm 7,3$  y  $33,8 \pm 11,2$ , respectivamente, con un alto cinismo:  $52,2 \pm 7,9$  y  $33,2 \pm 10,8$ , y con una eficacia profesional baja:  $53,0 \pm 7,7$  y  $36,5 \pm 13,2$ .

Un total de 87 (36,3%) embriólogos tuvieron al menos una dimensión de MBI-GS elevada, siendo en este grupo la media de PCS-12 y MCS-12,  $53,5 \pm 6,6$  and  $38,1 \pm 11,6$ , respectivamente. Solo 7 (2,9%) embriólogos presentaron valores altos a la vez en las tres dimensiones de MBI-GS, siendo en este grupo la media de PCS-12 y MCS-12,  $50,2 \pm 11,5$  and  $25,8 \pm 9,6$ , respectivamente.

## ANÁLISIS BIVARIANTE DEL ESTADO DE SALUD

Un menor estado de salud física (PCS-12) se asoció a embriólogos que refirieron sobrepeso, trabajaban más de 45h semanales, trabajaban con luz insuficiente, ruido no soportable, tenían

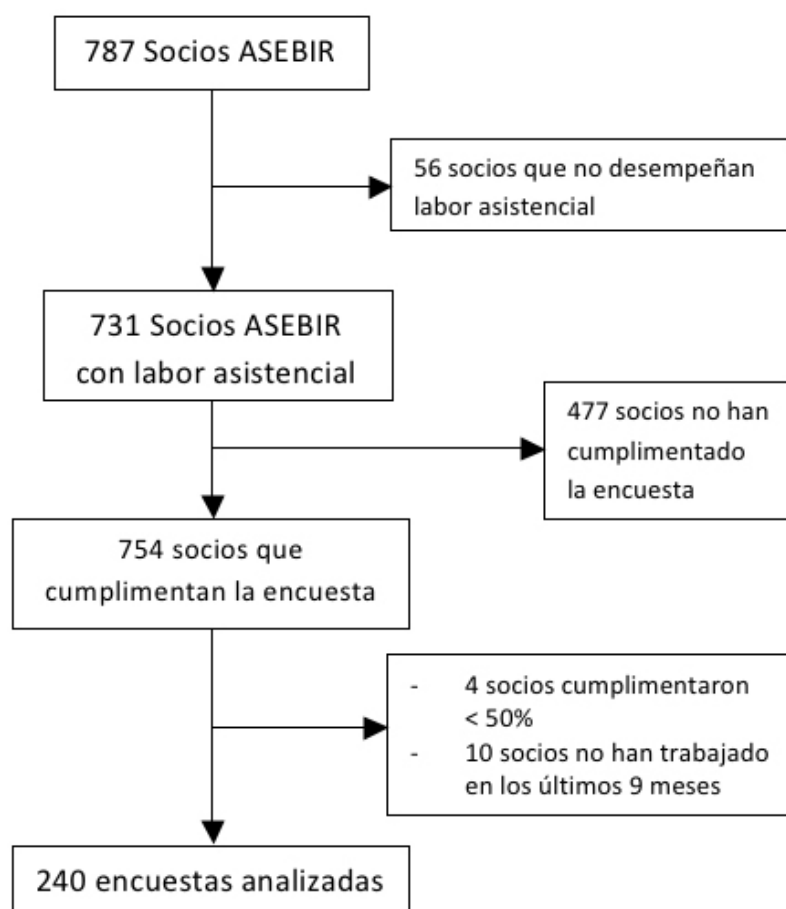


Figura 1. Diagrama de flujo.

Tabla IV.- Molestias físicas y estado de salud físico (PCS-12) y mental (MCS-12).

SALUD FÍSICA Y MENTAL	N (%)	PCS-12	MCS-12
<b>MOLESTIAS DE CABEZA</b>			
Siempre-Casi siempre	5 (2.11%)	56.18±6.37 (45.66;61.62)	39.89±11.04 <sup>b</sup> (23.46;52.74)
Muchas veces-Algunas veces	100 (42.37%)	52.54±6.95 <sup>a</sup> (30.66;67.59)	39.54±11.47 (14.10;57.43)
Solo algunas veces-Nunca	131 (55.50%)	55.18±5.06 (37.06;65.95)	45.68±9.99 (16.29;59.19)
<b>MOLESTIAS DE CUELLO</b>			
Siempre-Casi siempre	36 (15.12%)	50.02±7.10 <sup>c</sup> (30.66;61.30)	40.16±11.79 (17.09;57.67)
Muchas veces-Algunas veces	132 (55.46%)	54.37±5.89 (35.86;67.59)	41.80±11.05 (14.10;59.19)
Solo algunas veces-Nunca	70 (29.41%)	55.77±4.81 (38.73;65.95)	46.70±9.78 <sup>d</sup> (18.45;58.83)
<b>MOLESTIAS DE ESPALDA</b>			
Siempre-Casi siempre	44 (18.64%)	50.23±7.85 <sup>e</sup> (30.66;63.57)	38.92±12.78 <sup>f</sup> (14.10;57.67)
Muchas veces-Algunas veces	137 (58.05%)	54.38±5.51 (39.41;67.59)	42.95±10.63 (17.87;59.19)
Solo algunas veces-Nunca	55 (23.30%)	56.44±4.18 (38.73;65.95)	46.12±9.77 (18.45;58.83)

MOLESTIAS MIEMBROS SUPERIORES			
Siempre-Casi siempre	68 (29.05%)	53.52±6.78 (35.86;65.92)	41.24±10.91 (16.29;57.67)
Muchas veces-Algunas veces	154 (65.81%)	54.97±5.15 (39.41;67.59)	44.13±10.61 (14.10;59.19)
Solo algunas veces-Nunca	12 (5.12%)	45.57±6.98 <sup>g</sup> (30.66;53.44)	37.39±13.81 (17.09;56.38)
MOLESTIAS MIEMBROS INFERIORES			
Siempre-Casi siempre	7 (3.03%)	47.53±9.72 (30.66;60.28)	40.98±14.62 (17.09;56.38)
Muchas veces-Algunas veces	39 (16.88%)	50.59±7.01 (35.86;63.76)	43.70±11.69 (14.10;59.19)
Solo algunas veces-Nunca	185 (80.08%)	54.93±5.26 <sup>h</sup> (37.06;65.95)	43.03±10.72 (16.29;58.83)
MOLESTIAS OCULARES			
No	129 (53.97%)	55.41±4.93 (30.66;65.92)	44.39±10.74 (14.10;58.83)
Sí	110 (46.02%)	52.59±6.87 <sup>i</sup> (35.86;67.59)	41.36±11.17 (17.87;59.19)
PÉRDIDA DE AGUDEZA VISUAL			
No	106 (44.35%)	55.47±5.15 (37.06;67.59)	45.12±10.49 (14.10;58.83)
Sí	133 (55.64%)	52.96±6.46 <sup>j</sup> (30.66;64.09)	41.47±11.08 <sup>k</sup> (16.29;59.19)
ACCIDENTE LABORAL (≤2años)			
No	225 (93.75%)	54.19±5.83 (30.66;65.95)	43.10±10.94 (14.10;59.19)
Sí	15 (6.25%)	52.90±8.79 (38.15;67.59)	41.59±12.22 (20.12;57.67)

<sup>a</sup> Siempre-Casi siempre vs Muchas veces-algunas veces  $p < 0.01$ , <sup>b</sup> Siempre-Casi siempre vs Muchas veces-algunas veces  $p < 0.001$ , <sup>c</sup> Siempre-Casi siempre vs Muchas veces-algunas veces  $p < 0.001$ ; Siempre-Casi siempre vs Solo algunas veces-Nunca  $p < 0.001$ , <sup>d</sup> Solo algunas veces-Nunca vs Siempre-Casi siempre  $p < 0.05$ ; Solo algunas veces-Nunca vs Muchas veces-algunas veces,  $p < 0.01$ , <sup>e</sup> Siempre-Casi siempre vs Muchas veces-algunas veces  $p < 0.001$ ; Siempre-Casi siempre vs Solo algunas veces-Nunca  $p < 0.001$ , <sup>f</sup> Siempre-Casi siempre vs Solo algunas veces-Nunca  $p < 0.01$ , <sup>g</sup> Solo algunas veces-Nunca vs Siempre-Casi siempre  $p < 0.001$ ; Solo algunas veces-Nunca vs Muchas veces-algunas veces  $p < 0.001$ , <sup>h</sup> Solo algunas veces-Nunca vs Siempre-Casi siempre  $p < 0.01$ ; Solo algunas veces-Nunca vs Muchas veces-algunas veces  $p < 0.001$ , <sup>i</sup>  $p < 0.001$ , <sup>j</sup>  $p < 0.01$ , <sup>k</sup>  $p < 0.05$

molestias de cabeza, cuello, espalda, y miembros superiores e inferiores, además de molestias oculares y pérdida de agudeza visual y niveles más altos de agotamiento emocional.

Las puntuaciones de salud mental (MCS-12) fueron inferiores en embriólogos que refirieron que trabajaban con luz y ventilación insuficiente, temperatura inadecuada, estaban vacunados de la gripe, no recibieron formación sobre seguridad, además de molestias de cabeza, cuello, espalda y pérdida de agudeza visual y mayores niveles de agotamiento emocional, cinismo y menores niveles de eficacia profesional.

Agotamiento emocional y cinismo se asociaron negativamente con PCS-12 (Coeficiente de Pearson -0,25 ( $p < 0,001$ ) y -0,13 (NS), respectivamente) y MCS-12 (Coeficiente de Pearson -0,55 ( $p < 0,001$ ), y - 0,45 ( $p < 0,001$ ), respectivamente), mientras que la eficacia profesional se asoció positivamente con el PCS-12 y MCS-12 (Coeficiente de Pearson 0,10 (NS) y 0,26 ( $p < 0,001$ ), respectivamente).

## DISCUSIÓN

En comparación con muestras de referencia, la puntuación de estado físico de los embriólogos encuestados fue mayor. Profesionales de la salud

suelen tener mejores hábitos de salud que la población general y también mejores que otros trabajadores de nivel socioeconómico alto (Frank, 2004). Esto es coherente con el papel que el embriólogo clínico debe jugar en el asesoramiento de hábitos saludables a las parejas estériles especialmente en la lucha contra la obesidad y el tabaco.

La distribución de áreas con molestias musculoesqueléticas en embriólogos fue muy similar a la descrita en patólogos o microscopistas (Thompson et al, 2003; Fritzsche et al, 2012) siendo el miembro superior, la zona más frecuente.

La prevalencia de las molestias musculoesqueléticas en embriólogos es alta comparada con la población trabajadora (Punnett and Wegman, 2004; Hartvigsen et al., 2010), pero similar a la observada en patólogos o microscopistas (Kalavar et al., 1996; Thompson et al., 2003; Lorusso et al., 2007; Fritzsche et al., 2012). Entre los factores de riesgo asociados con el desarrollo de los síntomas se ha descrito: las horas de trabajo en el microscopio, la duración del trabajo sin pausas, el ritmo de trabajo rápido y malas condiciones ergonómicas de trabajo (Lorusso et al., 2007). El uso de equipos ergonómicamente optimizados podrían aliviar las molestias en un mayor porcentaje de embriólogos con dolor musculoesquelético, como fue descrito por Fritzsche et al., (2012) en patólogos. Desconocemos cuantos embriólogos estaban usando este tipo de equipamientos en el momento de la encuesta, pero el 31% de los embriólogos consideraron que las condiciones de trabajo no eran cómodas para desarrollar su trabajo.

El efecto del tiempo de trabajo en el PCS-12 fue negativo para el embriólogo que trabajan más de 45 horas / semana. Una alta carga de trabajo tiene un impacto directo sobre el estado de salud. Se ha observado una relación significativa entre la carga de trabajo y problemas de salud por otros autores (Kawada y Ooya, 2005; Krantz et al., 2005).

La puntuación media de salud mental total en embriólogos (43) fue moderadamente menor que la población normal (Vilagut et al., 2008). Sin embargo, la puntuación



de salud mental de los embriólogos en los terciles más altos de las dimensiones de SQT, fue algo menor que (36) en una muestra de pacientes psiquiátricos con síntomas o trastornos depresivos (Gill et al., 2007). Resultados similares se han observado en estudios sobre salud mental y SQT en médicos alemanes (Voltmer et al., 2010) y suizos (Bovier et al., 2009).

En este estudio, el 36,3% de los embriólogos españoles presentan altos niveles en una dimensión SQT en su trabajo, lo que indica que más de un tercio de todos los embriólogos en España se encuentran en alto riesgo de contraer el síndrome del quemado en el trabajo (SQT) (Maslach et al., 2001). Estos altos niveles de SQT pueden tener implicaciones preocupantes en el rendimiento laboral, dada la creciente evidencia de la vinculación del agotamiento emocional con menor calidad de la atención (West et al., 2009).

El agotamiento emocional se ha relacionado con la sobrecarga y la falta de control sobre los resultados y la toma de decisiones. Esto se debe principalmente al ambiente en el centro y el clima social del entorno de trabajo. El bajo nivel de salud mental del embriólogo puede ser debido en parte a su escasa adaptación al ambiente de su centro (Montero-Marín et al., 2012). Probablemente, no se adaptan sus expectativas laborales al ambiente de trabajo ni a su experiencia. El cinismo se ha relacionado con indiferencia (pocas ganas de progresar profesionalmente) y sentir falta de oportunidades para desarrollarse. Estos factores pueden provocar baja autoestima y sentimiento de frustración y monotonía (Schwab et al., 1993) que según nuestros resultados estarían influyendo negativamente sobre MCS-12 de los embriólogos.

La prevalencia observada de SQT en embriólogos españoles es mayor de la observada en otros profesionales de laboratorio clínico (Fritzsche et al., 2012) pero similar a la observada en facultativos de diferentes especialidades médicas (Voltmer et al., 2010; Wright et al., 2011) pero menor que la descrita en cirujanos (Balch et al., 2009) u obstetras (Palmer-Morales et al., 2007; Yoon et al., 2010; Fontán y Dueñas, 2010). Debe tenerse cuidado a la hora de comparar prevalencias de SQT pues se han descrito

Tabla V.- Dimensiones de MBI y estado de salud física (PCS-12) y mental (MCS-12).

MBI	N (%)	PCS-12	MCS-12
<b>AGOTAMIENTO EMOCIONAL</b>			
1º Tercil $\leq 1.5$	79 (31.73%)	55.32 $\pm$ 4.31 (38.15;65.95)	48.84 $\pm$ 8.51 (21.25;59.19)
2º Tercil 1.67-2.33	80 (32.13%)	54.80 $\pm$ 6.27 (37.06;67.59)	43.22 $\pm$ 9.77 <sup>b</sup> (20.12;57.67)
3º Tercil $\geq 2.5$	74 (29.72%)	52.06 $\pm$ 7.15 <sup>a</sup> (30.66;63.57)	36.36 $\pm$ 11.51 (14.10;57.43)
<b>CINISMO</b>			
1º Tercil $\leq 0.5$	102 (40.96%)	54.75 $\pm$ 5.14 (38.15;65.95)	47.10 $\pm$ 9.39 (22.72;59.19)
2º Tercil 0.75-1.5	75 (30.12%)	54.39 $\pm$ 6.38 (35.86;64.09)	42.50 $\pm$ 10.43 <sup>c</sup> (14.10;56.60)
3º Tercil 1.75	63 (25.30%)	52.53 $\pm$ 7.12 (30.66;67.59)	35.71 $\pm$ 11.03 <sup>d</sup> (17.09;54.32)
<b>EFICACIA PROFESIONAL</b>			
1º Tercil $\leq 4.33$	84 (33.73%)	53.56 $\pm$ 6.70 (30.66;67.59)	39.61 $\pm$ 11.72 <sup>e</sup> (17.09;57.67)
2º Tercil 4.5-5.17	72 (28.92%)	53.72 $\pm$ 5.43 (38.15;61.54)	44.62 $\pm$ 9.59 (14.10;57.43)
3º Tercil $\geq 5.33$	77 (30.92%)	55.06 $\pm$ 5.97 (35.86;65.95)	44.40 $\pm$ 10.92 (16.29;59.19)

<sup>a</sup> 3º Tercil vs 1º Tercil  $p < 0.01$ ; 3º Tercil vs 2º Tercil  $p < 0.05$

<sup>b</sup> 2º Tercil vs 1º Tercil  $p < 0.01$ ; 3º Tercil vs 1º Tercil  $p < 0.001$ ; 3º Tercil vs 2º Tercil  $p < 0.001$

<sup>c</sup> 2º Tercil vs 1º Tercil  $p < 0.05$

<sup>d</sup> 3º Tercil vs 1º Tercil  $p < 0.001$ ; 3º Tercil vs 2º Tercil  $p < 0.001$

<sup>e</sup> 1º Tercil vs 2º Tercil  $p < 0.05$ ; 1º Tercil vs 3º Tercil  $p < 0.05$

discrepancias en los criterios utilizados en su definición tras utilizar MBI (Trufelli et al., 2008; Nienhaus et al., 2012). Los estudios futuros deben examinar algunos factores que se correlacionan con el SQT y deberían incluir características personales (por ejemplo, la autoestima), de organización (por ejemplo, el apoyo de la organización, los recursos humanos y materiales), factores relacionados con la carga de trabajo (por ejemplo, el trabajo de fin de semana, satisfacción con las condiciones salariales, físicas y ambientales, turnos escalonados) y factor social (por ejemplo, los conflictos familiares debidos al trabajo).

La salud mental más baja podría justificar el menor porcentaje observado de embriólogos que piensa que a los 60 años estarán realizando su trabajo comparado con una población de referencia. Aunque sin diferencias estadísticamente significativas, hemos observado un MCS-12 medio más bajo en embriólogos que piensan que no estarán realizando su trabajo actual a los 60 años respecto a los que sí lo creen.

Hemos encontrado que el sexo se relaciona con MCS-12, las mujeres tienen menor MCS-12. Este resultado coincide con lo observado por otros autores sobre predictores de la salud mental en los médicos. En estos estudios, los autores observaron que la puntuación de salud mental más baja que se observaba en las mujeres médicas, se relaciona más con un patrón de sobre esfuerzo (alto nivel de compromiso) que de SQT (Voltmer et al., 2010; Buddeberg-Fischer et al., 2005). Este esfuerzo excesivo conduce a la interferencia del trabajo con la familia y aumenta el conflicto trabajo-familia (Peeters et al., 2004; Dikkers et al., 2007). Este conflicto se produce cuando las exigencias de la vida laboral son incompatibles con las exigencias de la vida familiar (Hämmig y Bauer, 2009; Mostert, 2011). Varios autores (Adams et al., 2008) han informado que las mujeres suelen sufrir más los conflictos entre trabajo y familia, lo que en parte podría justificar nuestros resultados. La interacción entre el trabajo y el hogar se considera un factor importante en la salud mental (Hämmig y Bauer, 2009; Knecht et al., 2010). El hecho

de que, en nuestro estudio, MCS-12 no esté relacionado con tener hijos o pareja sugiere que no solo las cuestiones relacionadas con los conflictos entre familia y trabajo estarían detrás de la relación observada entre sexo y MCS-12. Otros autores han sugerido que el aumento de la tensión relacionada con el trabajo observado en las mujeres puede ser consecuencia de las expectativas de trabajo relacionados con el género, estas diferencias provienen de una variedad de fuentes importantes, como los pacientes, colegas, gerentes o compañeros de trabajo. (McMurray et al., 2000).

En conclusión, nuestro estudio ha demostrado que el estado físico de los embriólogos es superior al de una población de referencia. Y que al igual que ocurre en otros profesionales del laboratorio clínico los dolores musculoesqueléticos y las molestias oculares se relacionan inversamente con la salud física de los embriólogos. También, existe una relación inversa de las horas trabajadas y el IMC con el estado de salud física. Embriólogos, especialmente mujeres, presentan una baja salud mental relacionada con SQT. Dado que este síndrome lleva a una calidad deficiente en la atención al paciente o a errores, las estrategias para la mejora de las condiciones laborales del embriólogo son fundamentales. Debiendo prestarse no solo atención a las horas de trabajo sino también a aspectos cualitativos del trabajo. Por otra parte, estrategias para afrontar el estrés laboral y los problemas laborales deberían formar parte de la formación de los embriólogos clínicos.

## AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a la Junta directiva de ASEBIR, al personal de la secretaría de ASEBIR y por supuesto a los socios de ASEBIR que participaron en el cuestionario.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adam S, Györfy Z, Susanszky E. Physician burnout in Hungary: A potential role for work family conflict. *J Health Psychol* 2008; 13:847-56.

Balch CM, Freischlag JA, Shanafelt TD. Stress and Burnout among surgeons understanding and managing the syndrome

and avoiding the adverse consequences. *Arch Surg* 2009; 144:371-6.

Bovier PA, Arigoni F, Schneider M, Gallacchi MB. Relationships between work satisfaction, emotional exhaustion and mental health among Swiss primary care physicians. *Eur J PublicHealth* 2009; 19:611-7.

Bresó E, Salanova M, Schaufeli W, Nogareda C. NTP 732: Síndrome de estar quemado por el trabajo "Burnout" (III): Instrumento de medición. INSHT. Ministerio de trabajo y asuntos sociales, España. Lastaccess 8 august 2013 [http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/701a750/ntp\\_732.pdf](http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/701a750/ntp_732.pdf)

Buddeberg-Fischer B, Klaghofer R, Buddeberg C. Arbeitsstress und gesundheitliches Wohlbefinden junger Ärztinnen und Ärzte. *Z Psychosom Med Psychother* 2005; 51:163-178.

Dikkers JS, Geurts SA, Kinnunen U, Kompier MA, Taris TW. Crossover between work and home in dyadic partner relationships. *Scand J Psychol* 2007; 48:529-38.

Fontán IM, Dueñas JL. Burnout syndrome in an obstetrics and gynaecology management unit. *Rev CalidAsist* 2010; 25:260-7.

Frank E. Physician health and patient care. *JAMA* 2004; 291:637.

Fritzsche FR, Ramach C, Soldini D, Caduff R, Tinguely M, Cassoly E, Moch H, Stewart A. Occupational health risks of pathologists - results from a nationwide online questionnaire in Switzerland. *BMC Public Health* 2012; 12:1054-1066.

Gill SC, Butterworth P, Rodgers B, Mackinnon A. Validity of the mental health component scale of the 12-item Short-Form Health Survey (MCS-12) as measure of common mental disorders in the general population. *Psychiatry Res* 2007; 152:63-71.

Gil-Monte PR. Factorial validity of Spanish adaptation of the Maslach Burnout Inventory-General Survey. *SaudPublica Mex* 2002; 44:33-40.

Hämmig O, Bauer GF. Work-life imbalance and mental health among male and female employees in Switzerland. *Int J Public Health*. 2009; 54:88-95.

Hartvigsen J, Lings S, Leboeuf-Yde C, Bakketeig L. Psychosocial factors at work in relation to low back pain and consequences of low back pain; a systematic, critical review of prospective cohort studies. *Occup Environ Med* 2004; 61:e2.

Kalavar S, Hunting KL. Musculoskeletal symptoms among cytotechnologists. *Lab Med* 1996; 11:765-769.

Kawada T, Ooya M. Workload and health complaints in overtime workers: a survey. *Arch Med Res* 2005; 36:594-7.

Knecht M, Bauer GF, Klaghofer R, Buddeberg-Fischer B, Stamm M, Hämmig O. Work-life conflicts and health among Swiss physicians--in comparison with other university graduates and with the general Swiss working population. *Swiss Med Wkly* 2010; 140:w13063.

Krantz G, Berntsson L, Lundberg U. Total workload, work stress and perceived symptoms in Swedish male and female with collar employees. *Eur J Public Health* 2005; 15:209-14.

Lorusso A, Bruno S, Caputo F, et al. Risk factors for musculoskeletal complaints among microscope workers. *G Ital Med LavErgon* 2007; 29:932-937.

Maslach C, Jackson SE. The measurement of experienced burnout. *J OccupBehav* 1981; 2:99-113.

Maslach C, Schaufeli WB, Leiter MP. Job Burnout. *Annu Rev Psychol* 2001; 52:397-422.

McMurray JE, Linzer M, Konrad TR, Douglas J, Shugerman R, Nelson K. The work lives of women physicians results from the physician work life study. The SGIM Career Satisfaction Study Group. *J Gen Intern Med*. 2000;15:372-80.

Mir O, Adam J, Gaillard R, Gregory T, Veyrie N, Yordanov Y, et al. Vaccination coverage among medical residents in Paris, France. *ClinMicrobiol Infect* 2012; 18:E137-9.

Montero-Marín J, Araya R, Blazquez BO, Skapinakis P, Vizcaino VM, García-Campayo J. Understanding burnout according to individual differences: ongoing explanatory power evaluation of two models for measuring burnout types. *BMC Public Health* 2012; 12:922-33.

Mostert, K. Job characteristics, work-home interference and burnout: Testing a structural

model in the South African context. *Int J Hum Factor Man* 2011; 22: 1036-1053.

Nienhaus A, Westermann C, Kuhnert S. Burnout among elderly care staff. A review of its prevalence. *Bitusndcehsugtzesundheitsblatt-Gesund* 2012; 55:211-22.

Palmer-Morales Y, Prince-Vélez R, Searcy-Bernal R. Burnout syndrome associated factors in gynecologists. *GinecolObstet Mex* 2007; 75:379-83.

Peeters MCW, de Jonge J, Janssen PPM, van der Linden S. Work-home interference, job stressors, and employee health in a longitudinal perspective. *Int J Stress Manag.* 2004; 11:305-22.

Punnett L, Wegman DH: Work-related musculoskeletal disorders: theepidemiologic evidence and the debate. *J Electromyogr Kinesiol* 2004; 14:13-23.

Salanova M, Schaufeli WB, Llorens S, Peiró JM, Grau R: Desde el "burnout" al "engagement": ¿una nueva perspectiva?. *Rev Psicología Trab Organizaciones* 2000; 16:117-34.

Schaufeli WB, Leiter MP, Maslach C, Jackson SE. The Maslach Burnout Inventory—General Survey. In: Maslach C, Jackson SE, Leiter MP, eds. *Maslach Burnout Inventory manual*. 3rd ed. Palo Alto, CA: Consulting Psychologists Press; 1996. p. 19-26.

Schwab RL, Jackson SE, Schuler RS. Educator burnout: sources andconsequences. *Educ Res Quartely* 1993; 10:14-30.

Thompson SK, Mason E, Dukes S. Ergonomics and cytotechnologists: reported musculoskeletal discomfort. *Diagn Cytopathol* 2003; 29:364-7.

Truffelli DC, Bensi CG, Garcia JB, Narahara JL, Abrão MN, Diniz RW, Miranda Vda C, Soares HP, Del Giglio A. Burnout in cancer professionals: a systematic review and meta-analysis. *Eur J CancerCare (Engl)* 2008; 17:524-31.

Vilagut G, Valderasa JM, Ferrera M, Garina O, López-García E, Alonso J. Interpretación de los cuestionariosde salud SF-36 y SF-12 en España:componentes físico y mental. *Med Clin (Barc)* 2008; 130:726-35.

Voltmer E, Schwappach DL, Frank E, Wirsching M, Spahn C. Work-related behavior and experience patterns and predictors of mental health in German physicians in medical practice. *Fam Med* 2010; 42:433-9.

Ware J Jr, Kosinski M, Keller SD. A 12-Item Short-Form Health Survey: construction of scales and preliminary tests of reliability and validity. *Med Care* 1996; 34:220-33.

West CP, Tan AD, Habermann TM, et al. Association of resident fatigue and distress with perceived medical errors. *JAMA* 2009; 302:1294-300.

Wright JG, Khetani N, Stephens D. Burnout among faculty physicians in an academic health science centre. *Paediatr Child Health* 2011; 16:409-413.

Yoon JD, Rasinski KA, Curlin FA. Conflict and emotional exhaustion in obstetrician gynaecologists: a national survey. *J Med Ethics* 2010; 36:731-735.

# EmbryoGen®

## The first medium with rhGM-CSF cytokine

- A new IVF medium for cleavage-stage embryos containing a naturally occurring cytokine
- Supports the natural mother-embryo communication
- A novel treatment option for some of the most challenged patients



origio

a CooperSurgical Company

## TRANSCRIPTÓMICA DE LA INFERTILIDAD MASCULINA: ¿CUÁL ES LA APLICACIÓN CLÍNICA?

Sandra García-Herrero<sup>1</sup>, Marcos Meseguer<sup>2</sup> y Nicolás Garrido<sup>2</sup>

<sup>1</sup> IVIOMICS. Paterna. Valencia

<sup>2</sup> IVI Valencia

[sandra.garcia@iviomics.com](mailto:sandra.garcia@iviomics.com)

### INTRODUCCIÓN

Hoy en día se asume que la infertilidad afecta alrededor de un 8% de las parejas en edad reproductiva, aunque este porcentaje varía según diferentes autores y la zona geográfica objeto de estudio; situándose alrededor de un 15% en Europa (Benagiano *et al.*, 2006, Sharlip *et al.*, 2002, Thonneau *et al.*, 1991).

El origen de la infertilidad es difícil de clasificar y/o determinar y aunque históricamente se ha asociado como un estigma y de manera casi exclusiva a la mujer, hoy en día se sabe que casi un 50% de los casos implican, a algún nivel, el factor masculino (Nallella *et al.*, 2006), siendo en un 20% la causa única y exclusiva de los casos de infertilidad y contribuyendo entre otros factores entre un 20-40% de las veces (Thonneau *et al.*, 1991). Sin embargo, un número considerable de hombres que no consiguen gestación con parejas sin patología, presentan parámetros seminales normales y se desconoce la causa que explique su infertilidad, (Altmae and Salumets., 2011, Lewis., 2007).

En el varón, la valoración del potencial fértil nos la da el espermograma, prueba que evalúa distintos parámetros microscópicos como la concentración o movilidad de sus espermatozoides. Sin embargo la consecución exitosa de una gestación también necesita que esos espermatozoides sean capaces de llevar a cabo ciertos procesos fisiológicos como la capacitación, el reconocimiento de la zona pelúcida o la reacción acrosómica (Henkel., 2012, Anton and Krawetz., 2012, Garrido *et al.*, 2008).

Por lo tanto, deducimos que puede haber un considerable número de

factores moleculares, no contemplados en los diferentes manuales de la OMS (Organización Mundial de la Salud, 2010) que no se evalúan y que pueden limitar el valor diagnóstico del espermograma, ya que un análisis de semen que esté dentro de los parámetros normales no indica necesariamente un potencial fértil satisfactorio que conlleve a la consecución de una gestación. De hecho varios trabajos sostienen que pacientes con problemas de infertilidad presentaban parámetros normales tanto para movilidad, concentración y morfología y otros varones de fertilidad probada, presentaban espermogramas anormales, cuestionando hasta qué punto es útil un espermograma (Nallella *et al.*, 2006, Altmae and Salumets., 2011, Lewis., 2007).

Además, el diagnóstico de la infertilidad masculina es complicado porque este puede ser variable dependiendo del momento en el que se haga o de la pareja femenina con la que se estudie (Garrido *et al.*, 2008). Por ello muchos autores, prefieren etiquetar a las muestras de semen como válidas o no, y no ser los pacientes los que resulten etiquetados como fértiles o infértiles. En este contexto, lo ideal sería disponer de múltiples muestras del mismo paciente tomadas en diferentes momentos, para elegir aquella más adecuada (Garrido *et al.*, 2011, Braundmeier and Miller., 2001).

En los últimos años, el mundo de la andrología ha estado explorando nuevos marcadores de infertilidad, marcado por la necesidad de establecer nuevas referencias que nos permitan conseguir una herramienta más robusta de evaluación espermática, especialmente aquellos relacionados con la integridad del ADN, estrés oxidativo y la apoptosis, aunque la literatura científica acerca de su utilidad, hoy por hoy, es bastante

controvertida (Evenson and Wixon., 2006a, Evenson and Wixon., 2006b, Henkel *et al.*, 2003, Henkel *et al.*, 2004, Meseguer *et al.*, 2008, Virro *et al.*, 2004, Muriel *et al.*, 2006, Bungum *et al.*, 2007, Agarwal and Said., 2005).

En esta revisión, vamos a describir un factor molecular que puede estar implicado en la fertilidad masculina y vamos a evaluar su posible utilización como herramienta diagnóstica con la ayuda de las tecnologías que nos permiten evaluar numerosas moléculas a la vez, en este caso, los microarrays de expresión que estudian el ARN mensajero presente en el espermatozoide.

### PRESENCIA Y PAPEL DE LOS ARNm EN LOS ESPERMATOZOIDES.

Durante muchos años, se ha considerado el espermatozoide como un mero contenedor o vehículo conductor que sólo proporcionaba el ADN paterno al futuro embrión, sin embargo esa visión clásica se ha ido modificando a la luz de nuevos hallazgos. Hoy en día se sabe, que además de proporcionar el genoma paterno, también deposita otros elementos al ovocito en el momento de la fecundación: factores solubles de activación ovocitaria, factores de transcripción y los centriolos (como parte fundamental de la maquinaria de división celular del embrión) (Schatten., 1994, Sutovsky and Schatten., 2000, Parrington *et al.*, 2002, Swann., 1994).

Hay muchos trabajos que describen la presencia de ARNm en los espermatozoides del eyaculado de diferentes especies, entre ellas, la especie humana (Kumar *et al.*, 1993, Wykes *et al.*, 1997, Chiang *et al.*, 1994, Goodwin *et al.*, 2000, Durkee *et al.*, 1998, Lambard *et al.*, 2004, Richter *et al.*, 1999). En un principio se sugería que estos eran productos remanentes de la



espermatogénesis, sin embargo cada vez son más las evidencias de que estos tienen un papel activo en diferentes procesos biológicos. Además el hecho de que haya una población tan rica de ARNm en una célula que sufre una remodelación celular que incluye una extrusión de casi todo su citoplasma antes de alcanzar su fase madura y que es transcripcionalmente inactiva, es muy intrigante y nos hace plantearnos si el ARNm no tendrá un papel o alguna función, más allá de una presencia "accidental" (Miller and Ostermeier., 2006a, Miller and Ostermeier., 2006b, Miller *et al.*, 2005, Miller *et al.*, 1999, Lalancette *et al.*, 2009, Lalancette *et al.*, 2008, Ostermeier *et al.*, 2005a, Krawetz., 2005a, Krawetz., 2005b, Jodar *et al.*, 2013 ).

Algunas funciones de los ARNm pueden estar ligadas por ejemplo a la regulación epigenética, (esto es, al establecimiento/mantenimiento de la impronta paterna) y al empaquetamiento selectivo del ADN paterno durante la última fase de la espermiogénesis. Este empaquetamiento selectivo parece que está regulado en algún nivel por ciertos ARNm presentes en el espermatozoide, que facilitan que determinadas zonas, no sean empaquetadas por protaminas, quedando las histonas. ¿Cuál puede ser la finalidad de este empaquetamiento selectivo? Se ha especulado que esas zonas "preparadas para la transcripción", podrían codificar para genes cuya activación es requerida, por ejemplo en el pronúcleo masculino durante el estadio de pre-división del embrión, y serían muy importantes hasta el momento de la transición materno-cigótica (Miller and Ostermeier., 2006a, Miller and Ostermeier., 2006b, Miller *et al.*, 2005a, Lalancette *et al.*, 2008a, Krawetz., 2005a, Krawetz., 2005b, Ostermeier *et al.*, 2004).

Concluimos, por el momento que aunque no se sabe con certeza si los ARNm son productos remanentes del proceso espermatogénico o si por otra parte participan en funciones estructurales y epigenéticas, los ARNm están presentes en el espermatozoide y son depositados junto al genoma

paterno en el ovocito en el momento de la fecundación (Ostermeier *et al.*, 2004). Este hecho nos sugiere que pueden tener un papel en el éxito reproductivo, por ello la caracterización de esta población de ARNm puede ser clave a la hora de diagnosticar problemas de infertilidad masculina e identificar marcadores (Braundmeier and Miller., 2001, Miller *et al.*, 2005, Lalancette *et al.*, 2009, Krawetz., 2005a, Krawetz., 2005b, Ostermeier *et al.*, 2005b, Lalancette *et al.*, 2008, Wykes *et al.*, 2000, Jodar *et al.*, 2013).

## LA TECNOLOGÍA DEL MICROARRAY COMO HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA

La entrada en escena de sistemas que permiten el análisis masivo de genes ha proporcionado una nueva dimensión a la hora de plantear y extraer conclusiones de los experimentos. Los microarrays fueron descritos por primera vez por Schenna en 1995 (Schena *et al.*, 1995) y nos permiten estudiar, por ejemplo, qué genes se expresan en un situación biológica concreta y compararla con una patológica y ver en qué se diferencian, dándonos una visión global por ejemplo de una enfermedad y de los mecanismos que operan en dicho proceso patológico, además de jugar un potencial papel en el diagnóstico de enfermedades.

Entre las diferentes plataformas de las "ómicas", la de los microarrays de expresión, (cDNA microarrays), que es capaz de detectar y medir los niveles de ARNm, es de especial interés dada la relevancia que hemos comentado anteriormente de las poblaciones de ARNm presentes en el espermatozoide y su posible relación con el éxito reproductivo. De hecho, el estudio del conjunto de ARNm que se expresan en una célula en un momento o situación determinada (transcriptoma) es la "ómica" denominada transcriptómica (Horcajadas *et al.*, 2007).

## ¿QUÉ ES UN MICROARRAY DE EXPRESIÓN?

Básicamente es un formato experimental en los que hay miles de sondas (oligonucleótidos) que están

ancladas en un punto determinado a un soporte sólido. El soporte sólido se expone a un conjunto de fragmentos de ARNm (cDNA) "problema" marcados con fluorescencia, procedentes del tejido o células que se desee analizar. Estos fragmentos se unirán a su sonda complementaria emitiendo una señal de fluorescencia. Los datos brutos generados por el microarray son leídos en un primer momento por un escáner. Posteriormente estos datos brutos son normalizados y transformados de forma matemática para eliminar el ruido de fondo de la técnica, de modo que el soporte informático interpreta las intensidades de fluorescencia, su ubicación dentro del soporte y nos la relaciona con la expresión de un determinado ARNm, ofreciendo una visión global de los cambios de expresión de miles de genes y generando un patrón de expresión que defina determinadas situaciones biológicas esto es, una especie de huella dactilar que identifique distintas condiciones fisiológicas permitiéndonos además, comparar distintas muestras/condiciones biológicas (Horcajadas *et al.*, 2007).

Esta tecnología genera un importante número de datos que hace necesario que usemos sistemas de análisis que nos ayuden a procesarlos e integrarlos en términos de sus implicaciones biológicas.

En la era post-genómica, la interpretación biológica de los largos listados de genes que se obtienen de los experimentos de microarrays es un auténtico reto y la ontología génica nace con este propósito proporcionándonos una interpretación funcional de las amplias listas de genes derivados de los estudios genómicos (Thomas *et al.*, 2007, Al-Shahrour *et al.*, 2005, Ashburner *et al.*, 2000).

## APLICACIONES CLÍNICAS DEL ANÁLISIS DE ARNM EN MEDICINA REPRODUCTIVA:

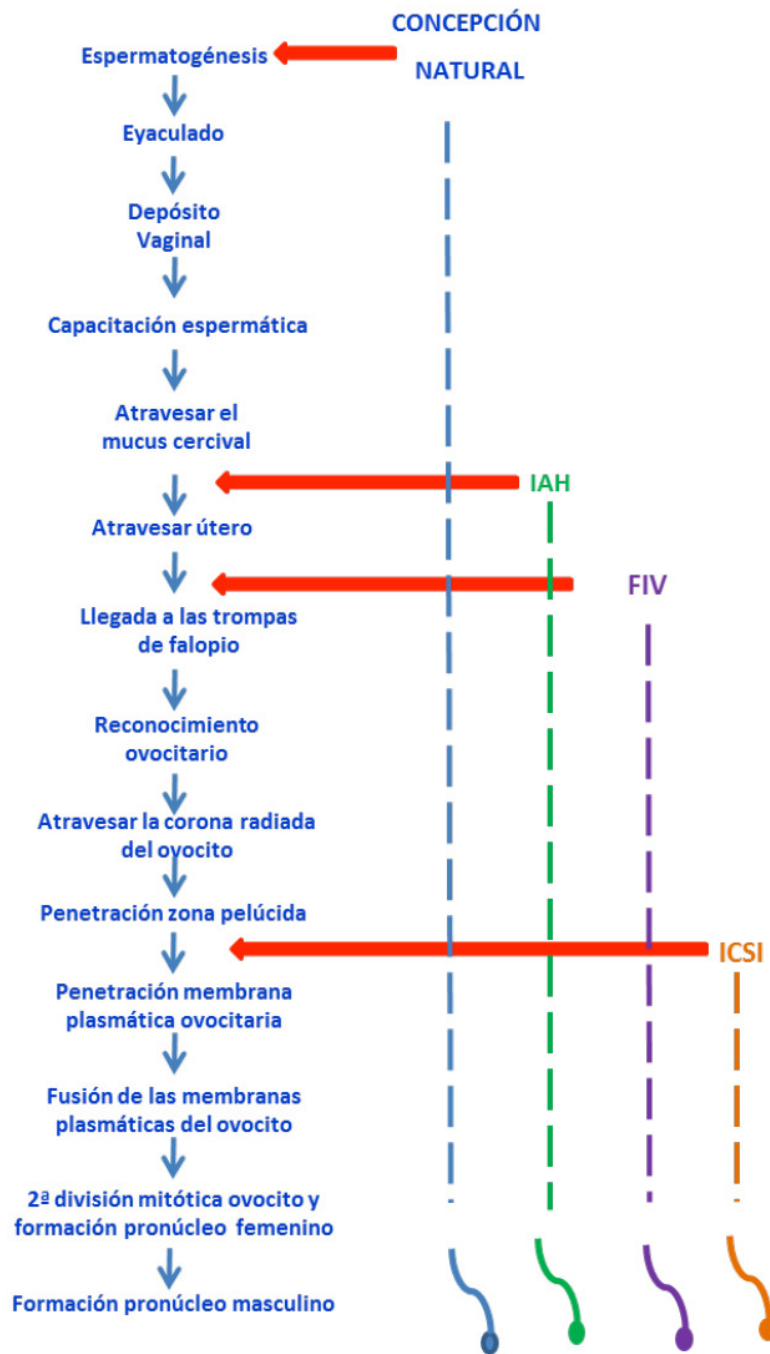
¿Puede tener un microarray un uso clínico en medicina reproductiva? Es obvio que se necesitan más herramientas que nos ayuden a tomar decisiones en la rutina clínica diaria para dirigir a nuestros pacientes a

aquellas técnicas/tratamientos de reproducción asistida (TRAs) que en cada uno de los casos conduzcan de manera más rápida al resultado deseado, por lo tanto si cumple esta anterior premisa, esa herramienta será de uso clínico.

En este sentido, el endometrio femenino y los espermatozoides son los aspirantes perfectos sobre los que desarrollar estas herramientas clínicas. El endometrio porque proporciona el ambiente y lugar donde se va a implantar el futuro embrión y los espermatozoides por las razones que hemos ido revelando anteriormente. Sin embargo, los ovocitos no serán los candidatos ideales, ya que son mucho menos numerosos que los gametos masculinos y su recuperación implica un proceso de estimulación ovárica y de aspiración folicular, aunque en un intento de aproximación para el estudio del gameto femenino lo que si se ha explorado son las células de granulosa que lo rodean (Schmidt *et al.*, 2013, Uyar *et al.*, 2013).

Respecto al endometrio, nuestro grupo ya ha desarrollado una herramienta diagnóstica basada en la tecnología del microarray que se llama *Endometrial Receptivity Array* (ERA). Se trata de un *array* de receptividad endometrial que se ha implementado en la rutina de la clínica y que orienta al ginecólogo sobre el momento más adecuado para hacer la transferencia embrionaria (Díaz-Gimeno *et al.*, 2013, Garrido-Gomez *et al.*, 2013, Ruiz-Alonso *et al.*, 2013).

El descubrimiento de estos ARNm en los espermatozoides y la aparición de la tecnología de análisis masivo de genes como las plataformas de microarrays, han propiciado que en los últimos años hayan surgido numerosos trabajos en los que se ha intentado explorar la relación entre el contenido de ARNm en espermatozoides y tejido testicular y el éxito reproductivo (Braundmeier and Miller., 2001, Lalancette *et al.*, 2009, Fox *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2004, Zhao *et al.*, 2006, Ostermeier *et al.*, 2002, Cedenho *et al.*, 2006).

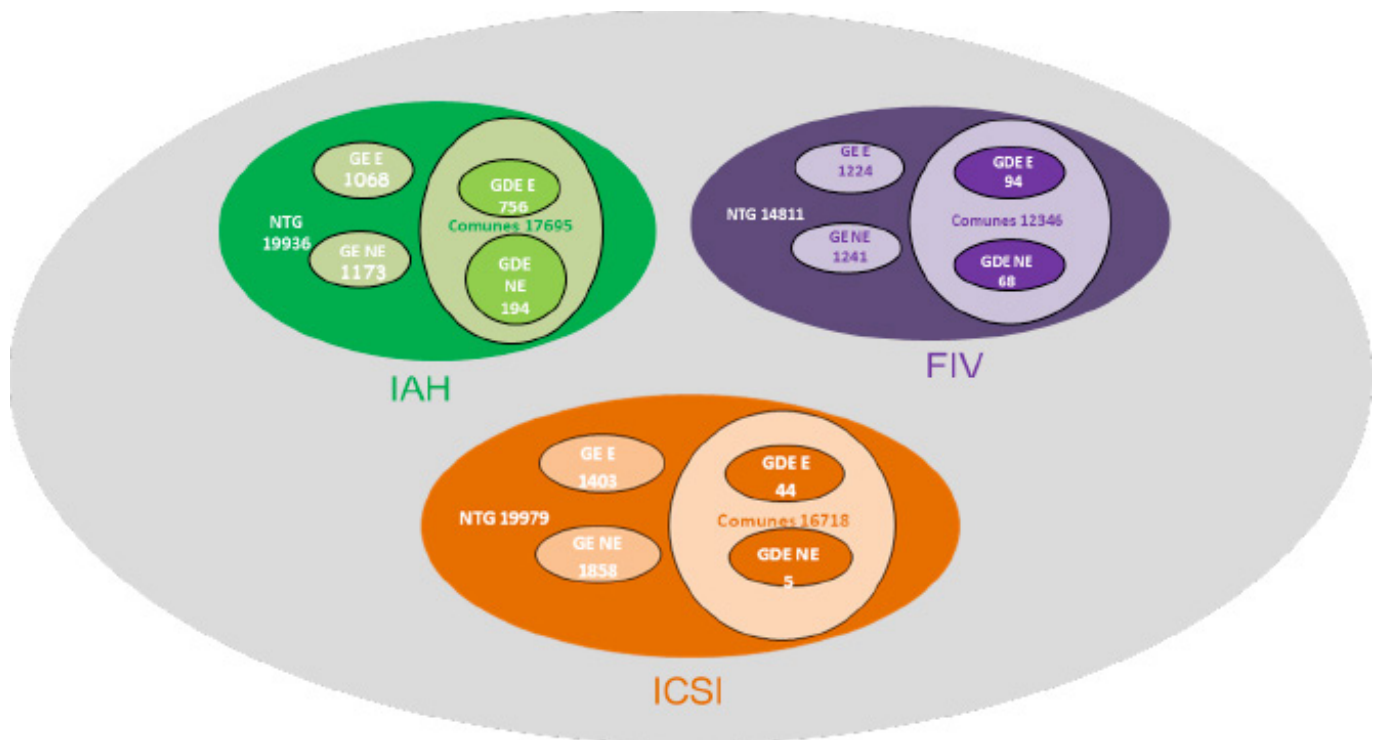


**Figura 1:** Representación de las barreras que tienen que ir superando los espermatozoides hasta llegar a la fecundación según el método de reproducción.

### ¿DÓNDE NOS ENCONTRAMOS AHORA?

En estos momentos, dentro de la investigación llevada a cabo por nuestro grupo, hemos intentado aprovechar la herramienta de los microarrays para responder a una necesidad clínica: definir la calidad de las muestras de semen y cuál es la probabilidad de alcanzar una gestación con una muestra determinada. Nuestra hipótesis de partida es que el ARNm existente en los espermatozoides

podría ser un indicador del potencial fértil de una muestra concreta, siendo el transcriptoma diferente entre aquellas muestras que sean capaces de dar lugar a un embarazo frente a aquellas que no. Nuestros estudios se han centrado en analizar mediante microarrays pequeñas alícuotas de muestras de espermatozoides que posteriormente se utilizan en la clínica para distintos TRAs (Garrido *et al.*, 2008, García-Herrero *et al.*, 2011, García-Herrero *et al.*, 2010a).



**Figura 2:** Diagrama que representa el número de GDE y GE según los perfiles de expresión génica en las diferentes TRAs estudiadas.  
**NTG:** Número total de genes expresados (todos aquellos genes que presentan señal en el microarray)  
**GDE:** Genes que presentan una expresión diferencial (una tasa de cambio diferente) al comparar un grupo con el otro (E vs. NE ó NE vs. E).  
**GE:** Genes que sólo se expresan en uno de los dos grupos (En el E o en el NE)

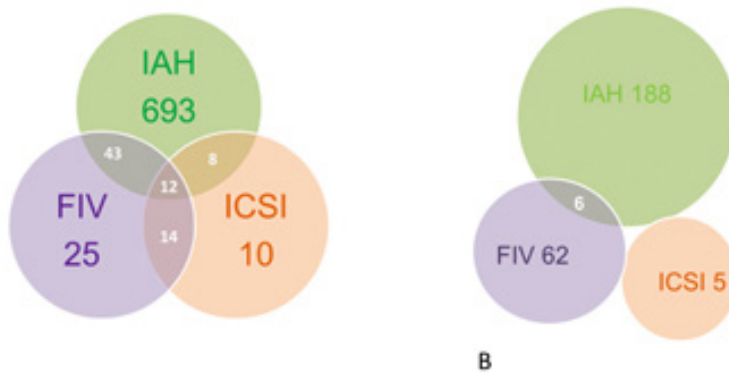
Además de encontrar diferentes poblaciones de ARNm entre muestras que logran embarazo o no, también nos planteamos si existen diferencias dependiendo del tipo de tratamiento de reproducción asistida, ya que cada técnica presenta diferentes niveles de exigencia funcional para los espermatozoides (por ejemplo, un espermatozoide que logre un embarazo mediante una inseminación artificial cumplirá más requerimientos moleculares que uno que lo consigue por inyección intracitoplasmática del espermatozoide). En una primera aproximación de nuestro estudio, se compararon muestras de donantes jóvenes y fértiles y de pacientes infértiles donde observamos diferencias entre sus transcriptomas (García-Herrero *et al.*, 2010b, Garrido *et al.*, 2009). El siguiente paso fue comparar muestras que lograban o no un embarazo dentro del grupo de pacientes, pero a tres niveles: IAH (Inseminación intrauterina homóloga), FIV (fecundación in vitro), e ICSI (inyección intracitoplasmática del espermatozoide) en un orden decreciente de exigencia funcional

(García-Herrero *et al.*, 2011, García-Herrero *et al.*, 2010a) (Figura 1).

Como se puede ver en la figura 2, nuestros resultados en función de los tratamientos de TRAs muestran diferencias de dos tipos: a) genes expresados diferencialmente (aquellos que se expresan a diferentes niveles en un grupo respecto a otro (**Genes diferencialmente expresados; GDE**), esto es en el grupo que **logra el embarazo (E) frente al grupo que no consigue embarazo (NE) y viceversa**) y b) genes exclusivamente expresados en uno de los grupos, en el que embaraza o en el que no (**Genes exclusivos; GE**). De esta manera quedaron definidas la "huellas dactilares del ARNm" de las muestras con o sin éxito reproductivo para cada una de las técnicas.

Estos resultados corroboraron nuestras dos hipótesis iniciales, la primera, que efectivamente existen diferencias entre las muestras que embarazan frente a las que no y que además estas diferencias dependen del TRA que estemos estudiando. Como podemos observar

el número de GDE es menor conforme más invasiva es la TRA a la que se haya sometido el paciente (de menor a mayor grado de intervención: IAH seguida de FIV y finalmente ICSI). Esto se traduce en que las diferencias entre las muestras que logran un embarazo frente a las que no, son cada vez menores, y por tanto los requerimientos moleculares que necesitan los espermatozoides para conseguir un embarazo también lo son cuanto mayor es el número de barreras biológicas que se obvian al utilizar cada TRA. Otra lectura de los datos nos revela que hace falta cumplir más requisitos para conseguir un embarazo que para no conseguir la gestación, porque el número de GDE siempre es mayor en el grupo con embarazo respecto al de no embarazo para todas las técnicas. Si además miramos los GDE que son comunes a las tres técnicas, tanto cuando se produce un embarazo como cuando no, el número de genes en común es mayor cuanto más parecidas son las técnicas, esto es que hay más genes comunes entre las IAH y la FIV que entre las IAH y la ICSI, reforzando la idea de que las exigencias moleculares de los



**Figura 3:** A: GDE comunes entre los grupos que logran el embarazo (Grupos E) entre todas las técnicas. B: GDE comunes entre los grupos que no logran el embarazo (Grupos NE) entre todas las técnicas.

espermatozoides para cada técnica son diferentes y que además disminuyen a mayor complejidad de ésta (**Figura 3**).

En la **tabla 1**, se pueden consultar aquellos genes más diferencialmente expresados o con una mayor intensidad de fluorescencia en el caso de los genes exclusivos hallados en cada grupo. El análisis ontológico nos muestra que algunos de ellos ya estaban descritos en funciones relacionadas con la reproducción, sin embargo muchos de ellos no, lo que nos da una idea del desconocimiento existente sobre la fisiología espermática y la reproducción masculina.

### ¿HACIA DÓNDE NOS DIRIGIMOS?

La meta hacia la que nos dirigimos es encontrar el perfil transcriptómico compatible con la gestación que nos permita predecir el éxito de los TRAs. Aunque pendiente de la confirmación mediante estudios clínicos, la posibilidad de disponer de una herramienta que compare perfiles compatibles con un embarazo frente a no embarazo para las principales TRAs, puede permitir a nivel clínico un cambio de aproximación en la técnica terapéutica de reproducción asistida a emplear. Ciertamente es que con este test sólo seríamos capaces de valorar el aspecto masculino, mientras el factor femenino todavía quedaría por estudiar.

También existe la posibilidad de encontrar nuevos biomarcadores entre todos los genes que se observan entre el

perfil transcriptómico, que nos ayuden a realizar una discriminación positiva o negativa de los espermatozoides más o menos capaces de lograr una gestación, mediante por ejemplo técnicas de separación celular como MACS (*magnetic activated cell sorting*) (Romany *et al.*, 2009).

En resumen, la tecnología del microarray tiene potencial para hacer una selección de aquellas muestras con más probabilidades de gestación así como el diagnóstico de posibles patologías moleculares existentes y no valoradas por el clásico espermiograma, así como la posibilidad de dar un consejo reproductivo más certero y personalizado.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Shahrouf F, Minguez P, Vaquerizas JM, Conde L, Dopazo J. BABELOMICS: A suite of web tools for functional annotation and analysis of groups of genes in high-throughput experiments. *Nucleic Acids Res.* 2005;33

Altmae S, Salumets A. A novel genomic diagnostic tool for sperm quality?. *Reprod Biomed Online.* 2011

Agarwal A, Said TM. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: A clinical approach. *BJU Int.* 2005;95(4):503-507

Anton E, Krawetz SA. Spermatozoa as biomarkers for the assessment of human male infertility and genotoxicity. *Syst Biol Reprod Med.* 2012;58(1):41-50

Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al. Gene ontology: Tool for the unification of biology. the gene ontology consortium. *Nat Genet.* 2000;25(1):25-29.

Benagiano G., Bastianelli C, Farris M. Infertility: a global perspective. *Minerva Ginecol.* 2006; 58: 445-457

Braundmeier AG, Miller DJ. The search is on: Finding accurate molecular markers of male fertility. *J Dairy Sci.* 2001;84(9):1915-1925

Bungum M, Humaidan P, Axmon A, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod.* 2007;22(1):174-179

Cedeno AP, Lima SB, Cenedeze MA, Spaine DM, Ortiz V, Oehninger S. Oligozoospermia and heat-shock protein expression in ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod.* 2006;21(7):1791-1794

Chiang MH, Steuerwald N, Lambert H, Main EK, Steinleitner A. Detection of human leukocyte antigen class I messenger ribonucleic acid transcripts in human spermatozoa via reverse transcription-polymerase chain reaction. *Fertil Steril.* 1994;61(2):276-280

Diaz-Gimeno P, Ruiz-Alonso M, Blesa D, et al. The accuracy and reproducibility of the endometrial receptivity array is superior to histology as a diagnostic method for endometrial receptivity. *Fertil Steril.* 2013;99(2):508-517

Durkee TJ, Mueller M, Zinaman M. Identification of estrogen receptor protein and messenger ribonucleic acid in human spermatozoa. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;178(6):1288-1297.

Evenson D, Wixon R. Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reprod Biomed Online.* 2006a;12(4):466-472

Evenson DP, Wixon R. Predictive value of the sperm chromatin assay in different populations. *Fertil Steril.* 2006b;85(3):810-1; author reply 811-

Fox MS, Ares VX, Turek PJ, Haqq C, Reijo Pera RA. Feasibility of global gene expression analysis in testicular biopsies from infertile men. *Mol Reprod Dev.* 2003;66(4):403-421



		Nombre	Número de acceso GenBank	Tasa de cambio		Nombre	Número de acceso de GenBank	Valor de fluorescencia
IAH	Sobreexpresados E vs NE	FCGR3A	NM_000569	20,71	Exclusivos grupo E	IL8RA	NM_000634	9,916
		OSM	NM_020530	19,6		CYSLTR2	NM_020377	9,732
		FPR1	NM_002029	18,49		AK055428	AK055428	9,647
		CXCL1	NM_001511	17,83		P2RY14	NM_014879	9,517
		AQP9	NM_020980	17,75		C8orf39	AF116672	9,5
		TMEM154	NM_152680	16,21		PRG1	NM_002727	9,372
		PI3	NM_002638	15,96		IFIT2	NM_001547	9,344
		LILRB2	NM_005874	15,35		BTNL8	NM_001040462	9,218
		VNN2	NM_004665	15,22		STK4	NM_006282	9,175
	APOBEC3A	NM_145699	14,1	SIKE	NM_025073	9,054		
	Sobreexpresados NE vs E	AK000872	AK000872	5,42	Exclusivos grupo NE	THC2638360	THC2638360	10,428
		ENST00000303697	ENST00000303697	5,13		CDC37L1	NM_017913	10,382
		ZNF224	BC002889	4,68		THC2547195	THC2547195	9,875
		FLJ20581	ENST00000331849	4,55		NOX1	NM_007052	9,461
		CAMK2N2	NM_033259	4,45		CLCNKB	NM_000085	9,147
		CGB1	NM_033377	4,26		THC2555234	THC2555234	9,069
		THC2541992	THC2541992	3,98		THC2648250	THC2648250	9,022
		THC2609820	THC2609820	3,87		NETO1	NM_138966	8,873
		LCE2D	NM_178430	3,75		THRSP	NM_003251	8,815
VPS18	NM_020857	3,7	AADAC	NM_001086	8,264			
FIV	Sobreexpresados E vs NE	C10orf119	NM_024834	34,27	Exclusivos grupo E	MMP12	NM_002426	9,276
		SPP1	NM_001040058	32,72		C10orf119	NM_024834	9,252
		TGFB1	NM_000358	17,44		CLEC4E	NM_014358	8,602
		CD163	NM_004244	15,24		ADAMDEC1	NM_014479	8,526
		ADM	NM_001124	14,34		PTPN12	NM_002835	8,248
		RGS2	NM_002923	13,98		PLEK	NM_002664	8,018
		MMP9	NM_004994	13,66		CXCR7	NM_001047841	7,87
		CTS1	NM_001912	13,56		MAP3K8	NM_005204	7,805
		MT1M	NM_176870	12,91		LYZ	NM_000239	7,788
	Sobreexpresados NE vs E	IFI30	NM_006332	12,82	Exclusivos grupo NE	INDO	NM_002164	7,734
		PLA2G2A	NM_000300	42,31		C10orf64	BC034937	8,369
		SH3RF2	NM_152550	8,05		MSH4	NM_002440	7,969
		LLEP1	NM_001010857	7,67		DCC	NM_005215	7,106
		HSPA1L	NM_005527	5,76		MYH7	NM_000257	7,031
		DUSP21	NM_022076	5,5		INPP5F	NM_014937	7,008
		TSPAN16	NM_012466	5,42		C4orf6	NM_005750	6,952
		C10orf62	NM_001009997	5,4		ENST00000359466	ENST00000359466	6,926
		SMAD9	NM_005905	5,33		TGM4	NM_003241	6,92
ICSI	Sobreexpresados E vs NE	SPATA20	NM_022827	5,15	Exclusivos grupo E	WDR87	ENST00000303868	6,909
		C16orf78	NM_144602	5,14		HSFX1	NM_016153	6,772
		APOE	NM_000041	28,27		FSTL4	NM_015082	10,636
		APOC1	NM_001645	27,9		TNMD	NM_022144	10,43
		CFD	NM_001928	7,74		LOC646808	XR_017339	9,793
		CTSZ	NM_001336	6,85		C22orf26	NM_018280	9,756
		HMOX1	NM_002133	6,58		CXorf34	NM_024917	9,446
		FTL	NM_000146	6,35		MBOAT4	AF359269	9,378
		TGFB1	NM_000358	6,06		UBQLN4	NM_020131	9,361
	Sobreexpresados NE vs E	ENST00000317633	ENST00000317633	4,09	Exclusivos grupo NE	ALDOC	NM_005165	9,136
		COX7B2	NM_130902	3,82		ANGPTL4	NM_139314	8,869
		C19orf36	NM_001039846	3,8		SHFM3P1	AF174606	8,741
		ANKRD7	NM_001077708	3,79		DSG1	NM_001942	9,996
		CDKN2D	NM_001800	3,7		RPGR	NM_001023582	9,053
						KLRC3	NM_007333	8,902
						CYP3A7	NM_000765	8,794
						ERN2	NM_033266	8,744
						RP11-327P2.4	AK124707	8,67

**Tabla I:** Los 10 genes más diferencialmente expresados (GDE) y exclusivos (GE) de cada grupo (GRUPO E Y NE) ordenados por tasa de cambio y valor de fluorescencia respectivamente, para cada TRA.

García-Herrero S, Garrido N, Martínez-Conejero JA, Remohi J, Pellicer A, Meseguer M. Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2011;22(1):25-36

García-Herrero S, Meseguer M, Martínez-Conejero JA, Remohi J, Pellicer A, Garrido

N. The transcriptome of spermatozoa used in homologous intrauterine insemination varies considerably between samples that achieve pregnancy and those that do not. *Fertil Steril*. 2010a Sep;94(4):1360-73

García-Herrero S, Garrido N, Martínez-Conejero JA, Remohi J, Pellicer A, Meseguer M. Ontological evaluation of transcriptional

differences between sperm of infertile males and fertile donors using microarray analysis. *JARG*. 2010b; 27(2-3):111-20

Garrido N, Bellver J, Remohi J, Simon C, Pellicer A. Cumulative live-birth rates per total number of embryos needed to reach newborn in consecutive in vitro fertilization (IVF) cycles: A new approach to measuring

- the likelihood of IVF success. *Fertil Steril*. 2011;96(1):40-46
- Garrido N, Martínez-Conejero JA, Jauregui J, et al. Microarray analysis in sperm from fertile and infertile men without basic sperm analysis abnormalities reveals a significantly different transcriptome. *Fertil Steril*. 2009;91(4):1307-1310
- Garrido N, Remohi J, Martínez-Conejero JA, García-Herrero S, Pellicer A, Meseguer M. Contribution of sperm molecular features to embryo quality and assisted reproduction success. *Reprod Biomed Online*. 2008;17(6):855-865
- Garrido-Gomez T, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Diaz-Gimeno P, Vilella F, Simon C. Profiling the gene signature of endometrial receptivity: Clinical results. *Fertil Steril*. 2013;99(4):1078-1085
- Goodwin LO, Karabinus DS, Pergolizzi RG. Presence of N-cadherin transcripts in mature spermatozoa. *Mol Hum Reprod*. 2000;6(6):487-497
- Henkel R. Sperm preparation: State-of-the-art--physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. *Asian J Androl*. 2012;14(2):260-269. doi: 10.1038/aja.2011.133; 10.1038/aja.2011.133.
- Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, et al. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril*. 2004;81(4):965-972. doi: 10.1016/j.fertnstert.2003.09.044.
- Henkel R, Kierspel E, Hajimohammad M, et al. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod Biomed Online*. 2003;7(4):477-484.
- Horcajadas JA, Pellicer A, Simon C. Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: New times, new opportunities. *Hum Reprod Update*. 2007;13(1):77-86
- Jodar M, Selvaraju S, Sendler E, Diamond MP, Krawetz SA, for the Reproductive Medicine Network. The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs. *Hum Reprod Update*. 2013. doi: 10.1093/humupd/dmt031
- Krawetz SA. Paternal contribution: New insights and future challenges. *Nat Rev Genet*. 2005a;6(8):633-642
- Krawetz SA. On the significance of RNA in human sperm. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2005b;11(3):170-174
- Kumar G, Patel D, Naz RK. c-MYC mRNA is present in human sperm cells. *Cell Mol Biol Res*. 1993;39(2):111-117
- Lalancette, C., Platts, A.E., Johnson, G.D., Emery, B.R., Carrell, D.T., Krawetz, S.A. 2009. Identification of human sperm transcripts as candidate markers of male fertility. *J. Mol. Med.* 87, 735-748
- Lalancette C, Miller D, Li Y, Krawetz SA. Paternal contributions: New functional insights for spermatozoal RNA. *J Cell Biochem*. 2008.
- Lalancette C, Platts AE, Johnson GD, Emery BR, Carrell DT, Krawetz SA. Identification of human sperm transcripts as candidate markers of male fertility. *J Mol Med*. 2009;87(7):735-748
- Lambard S, Galeraud-Denis I, Saunders PT, Carreau S. Human immature germ cells and ejaculated spermatozoa contain aromatase and oestrogen receptors. *J Mol Endocrinol*. 2004;32(1):279-289
- Lewis SE. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility?. *Reproduction*. 2007;134(1):31-40
- Meseguer M, Martínez-Conejero JA, O'Connor JE, Pellicer A, Remohi J, Garrido N. The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: A new model to study a male infertility prognostic factor. *Fertil Steril*. 2008;89(5):1191-1199
- Miller D, Ostermeier GC. Spermatozoal RNA: Why is it there and what does it do?. *Gynecol Obstet Fertil*. 2006a;34(9):840-846
- Miller D, Ostermeier GC. Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Hum Reprod Update*. 2006b;12(6):757-767
- Miller D, Ostermeier GC, Krawetz SA. The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends Mol Med*. 2005;11(4):156-163
- Miller D, Briggs D, Snowden H, et al. A complex population of RNAs exists in human ejaculate spermatozoa: Implications for understanding molecular aspects of spermiogenesis. *Gene*. 1999;237(2):385-392
- Muriel L, Garrido N, Fernandez JL, et al. Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2006;85(2):371-383
- Nallella KP, Sharma RK, Aziz N, Agarwal A. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertil Steril*. 2006;85(3):629-634
- Ostermeier GC, Goodrich RJ, Moldenhauer JS, Diamond MP, Krawetz SA. A suite of novel human spermatozoal RNAs. *J Androl*. 2005a;26(1):70-74
- Ostermeier GC, Goodrich RJ, Diamond MP, Dix DJ, Krawetz SA. Toward using stable spermatozoal RNAs for prognostic assessment of male factor fertility. *Fertil Steril*. 2005b;83(6):1687-1694
- Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD, Diamond MP, Krawetz SA. Reproductive biology: Delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature*. 2004;429(6988):154
- Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, Khatri P, Krawetz SA. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet*. 2002;360(9335):772-777
- Parrington J, Jones ML, Tunwell R, Devader C, Katan M, Swann K. Phospholipase C isoforms in mammalian spermatozoa: Potential components of the sperm factor that causes Ca<sup>2+</sup> release in eggs
- Richter W, Dettmer D, Glander H. Detection of mRNA transcripts of cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes in ejaculated human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*. 1999;5(8):732-736
- Romany L, Meseguer M, Remohi J, Pellicer A, Garrido N. Métodos para la selección objetiva de espermatozoides competentes. *RIF*. 2009;26:425-435
- Ruiz-Alonso M, Blesa D, Diaz-Gimeno P, et al. The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with

repeated implantation failure. *Fertil Steril*. 2013; Epub ahead of print

Schatten G. The centrosome and its mode of inheritance: The reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. *Dev Biol*. 1994;165(2):299-335

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 1995;270(5235):467-470

Schmidt J, Wejdegard B, Mikkelsen AL, Lindenberg S, Nilsson L, Brannstrom M. Differential expression of inflammation-related genes in the ovarian stroma and granulosa cells of PCOS women. *Mol Hum Reprod*. 2013. doi: 10.1093/molehr/gat051

Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, et al. Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril*. 2002;77(5):873-882

Sutovsky P, Schatten G. Paternal contributions to the mammalian zygote: Fertilization after sperm-egg fusion. *Int Rev Cytol*. 2000;195:1-65

Swann K. Ca<sup>2+</sup> oscillations and sensitization of Ca<sup>2+</sup> release in unfertilized mouse eggs injected with a sperm factor. *Cell Calcium*. 1994;15(4):331-339

Thomas PD, Mi H, Lewis S. Ontology annotation: Mapping genomic regions to biological function. *Curr Opin Chem Biol*. 2007;11(1):4-11

Thonneau P, Marchand S, Tallec A, et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three french regions (1988-1989). *Hum Reprod*. 1991;6(6):811-816

Uyar A, Torrealday S, Seli E. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertil Steril*. 2013;99(4):979-997. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.01.129; 10.1016/j.fertnstert.2013.01.129.

Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and

intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril*. 2004;81(5):1289-1295

Wang H, Zhou Z, Xu M, et al. A spermatogenesis-related gene expression profile in human spermatozoa and its potential clinical applications. *J Mol Med*. 2004;82(5):317-324

World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. In: 5th ed. ed. Geneva: ; 2010

Wykes SM, Miller D, Krawetz SA. Mammalian spermatozoal mRNAs: Tools for the functional analysis of male gametes. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 2000;32(1):77-81

Wykes SM, Visscher DW, Krawetz SA. Haploid transcripts persist in mature human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*. 1997;3(1):15-19

Zhao YX, Li QL, Wang ZX, Wang YF, Wang LY, Qiao ZD. Characterization of the mRNA profile in ejaculated spermatozoa from healthy fertile men. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2006;12(10):900-903

## METABOLÓMICA Y SELECCIÓN EMBRIONARIA ¿ESTAMOS PREPARADOS?

Ana Busquets

[ana.busquets@santiagodexeus.com](mailto:ana.busquets@santiagodexeus.com)

Desde los inicios de la Fecundación in Vitro (FIV), los embriólogos clínicos han buscado diversas vías de selección embrionaria para conseguir aquel o aquellos embriones con mayor potencial de embarazo.

Una selección embrionaria efectiva nos permite poder reducir el número de embriones a transferir y así evitar un embarazo múltiple con sus consecuentes riesgos.

Las características morfológicas y las tasas de división celular son actualmente los principales parámetros de selección embrionaria, y aunque es sabido que dichos parámetros

son pobres indicadores del potencial implantatorio (Bromer y col., 2008) son actualmente los más utilizados en los laboratorios de FIV.

Solo un 30% de los embriones procedentes de ciclos de FIV son transferidos al útero (Min y col., 2008) y de estos el 84,9% no consiguen dar lugar a una gestación a término (Kovalevsky y col., 2005).

Se sabe que muchos de los factores que contribuyen en la calidad ovocito /embrión no necesariamente se ven reflejados en la morfología de éstos. Es por ello que en los últimos años se han ido desarrollando diferentes técnicas

que aportan información adicional sobre la viabilidad embrionaria.

Una de estas técnicas es la metabolómica, que tiene como última finalidad, la identificación y la cuantificación de todos los metabolitos presentes en una muestra biológica, obtenida con precisión a partir de unas condiciones experimentales definidas.

Si aplicamos el termino metabolómica a la embriología clínica se definiría como el estudio de aquellos factores presentes en el medio de cultivo que han sido secretados por el ovocito / embrión como resultando de procesos metabólicos o lesiones celulares.

Muchos estudios han demostrado que los embriones modifican su medio de cultivo y estas modificaciones se pueden valorar y correlacionar con el desarrollo embrionario y su potencial implantatorio. (Renard 1980 y col., 1980; Gardner y Leese, 1986)

A pesar de que las metabólicas llevan aplicándose en diferentes campos desde hace algún tiempo, ha despertado un gran interés en la embriología clínica por ser una técnica de selección embrionaria no invasiva.

En los últimos años se han realizado numerosos estudios utilizando técnicas no invasivas donde la aplicación de parámetros metabólicos han permitido aportar más información sobre el desarrollo embrionario así como su capacidad de implantación (Botros y col., 2008; Seli 2010) (Marhuenda – Egea y col., 2010). Estos estudios demuestran que existe una diferencia subyacente a nivel metabólico entre los embriones que dan lugar a embarazo con los que no, dándonos así una aproximación sobre la viabilidad de dichos embriones.

La aplicación de metabólica a nivel preimplantatorio proporciona información de la actividad celular en el marco específico del desarrollo embrionario. El consumo de ciertas sustancias así como una extensa lista de productos secretados al medio, permite hacer un seguimiento a diferentes niveles, líquido folicular, ovocito, complejo cúmulo- ovocito, desarrollo embrionario... (Nel-Themaat y col., 2011)

La investigación de los diferentes complejos metabólicos requiere tecnologías de análisis específicas, así pues espectroscopios y técnicas de cromatografía son los principales candidatos ya que son metodologías de alto rendimiento debido a que aportan gran cantidad de información a partir de los diferentes fluidos biológicos.

Hasta ahora la mayoría de estudios metabólicos publicados se centran principalmente en definir los diferentes productos que podemos encontrar en los medios de cultivo tales como

determinados aminoácidos, glucosa, piruvato y oxígeno correlacionándolos con calidad embrionaria, potencial de implantación y tasa de niño vivo en casa.

Todo parece indicar que embriones en estadio celular como en estadio de blastocistos que presentan una baja calidad morfológica pero unos valores metabólicos determinados dan lugar a embarazo.

En la última década ha habido un gran aumento de publicaciones sobre el campo de las metabólicas aplicado al desarrollo embrionario y su potencial de implantación. Resaltar que investigaciones futuras deberán centrarse en el desarrollo de técnicas no invasivas y fiables que permitan seleccionar aquellos ovocitos y embriones con mayor potencial implantatorio, permitiendo de este modo precisar el número de embriones a transferir y reducir así el número de gestaciones múltiples manteniendo o incluso aumentando las tasas de implantación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Botros L, Sakkas D, Seli E. Metabolomics and its application for non invasive embryo assessment in IVF. *Mol Hum Reprod* 2008;14:679-690.

Bromer JG, Seli E. Assesment of embryo viability in assisted reproductive technologies: shortcomings of current approaches and the emerging role of metabolomics. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008; 20:234-241.

Gardner DK, Leese HJ. Non invasive measurement of nutrient uptake by single cultured preimplantation mouse embryos. *Hum Reprod* 1986; 1:25-27.

Kovalevsky G, Patricio P, High rates of embryo wastage with use of assisted reproductive technology: a look at the trends between 1995 and 2001 in the United States. *Fertil Steril* 2005; 84:325-330.

Marhuenda – Egea, F.C., Martínez-Sabater, E., Gosálvez – Alvarez, R., Lledo, Ten, J., & Bernabeu, R. ( 2010). A crucial step in assisted reproduction technology: Human embryo selection using

metabolomic evaluation. *Fertil Steril* 2010; 94(2), 772 -774.

Min JK, Claman P, Hughes E, Cheung AP, Claman P, Fluker M, et al. Guidelines of the number of embryos to transfer following in Vitro fertilization no.182, September 2006. *Int J Gyneacol Obstet* 2008; 102:203-216.

Nel-Themaat I, Nagy Z.P. A review of the promises and pitfalls of oocyte and embryo metabolomics. *Placenta* 2011; Sep; 32 Suppl 3: S257-63

Renard JP, Philippon A, Menezo Y. *In -vitro* up take of glucosa by bovine blastocysts. *J Reprod Fétil* 1980; 58:161-164.

Seli E, Vergouw CG, Morita H, Botros L, Roos P, Lambalk CB, Yamashita N, Kato O, Sakkas D. Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer. *Fertil Steril* 2010; 94:2849-2858.





# INNOVANDO

ayer, hoy y siempre



## ¿QUÉ ESPERA UN GINECÓLOGO DE UN EMBRIÓLOGO CLÍNICO?

Antonio Gosálvez, Miriam Iglesias, Laura Vidal.  
Unidad de Reproducción Asistida.  
Hospitales Quirón en Madrid.  
[agosalvez.mad@quiron.es](mailto:agosalvez.mad@quiron.es)

### INTRODUCCIÓN

Son muchos los ámbitos de la medicina actual que requieren organizarse como Unidades Interdisciplinarias: el abordaje integral de la oncología, el manejo de la diabetes o la reproducción asistida son buenos ejemplos donde se requiere la colaboración continuada de médicos, biólogos, técnicos de laboratorio, psicólogos, expertos en atención al paciente...

En el entorno de la reproducción asistida, el laboratorio es el centro neurálgico de la actividad y tiene el mismo protagonismo que la cocina de un restaurante o el quirófano de una Unidad de cirugía.

Aunque los ginecólogos debemos conocer en profundidad algunos aspectos del trabajo cotidiano de los embriólogos, no es fácil que comprendamos lo intensa que es la relación humana entre los miembros de un laboratorio, y tampoco es fácil que valoremos lo importante que es el compañerismo, la comprensión, la capacidad de improvisación... todas ellas cualidades de lo que entendemos ser "una buena persona".

Un ginecólogo espera de un embriólogo algo muy sencillo:

*¿QUE SUS VIRTUDES COINCIDAN CON LAS CUALIDADES ADECUADAS A SU PUESTO!*

En esta ponencia vamos a analizar los cuatro aspectos fundamentales:

- Tareas de un laboratorio.
- Cualidades adecuadas para realizar las tareas.
- Los diferentes puestos de trabajo.
- Las cualidades convenientes para cada puesto de trabajo.

### PARTE 1. LAS TAREAS DE UN LABORATORIO

¡Cada laboratorio es único y diferente a los demás! Por ello, las labores a realizar pueden variar mucho de unos a otros: desde el laboratorio que dispone de un solo embriólogo a tiempo parcial hasta el laboratorio que trabaja en turnos de mañana y tarde con más de treinta personas, existe toda una amplia gama de posibilidades.

A modo de ejemplo, describimos el día a día de nuestro laboratorio de Quirón Madrid, en el que podemos describir más de CUARENTA tareas diferentes:

#### LABORATORIO DE REPRODUCCION. QUIRON MADRID.

##### 1) TAREAS DIARIAS

###### 1.1 Primera hora de la mañana:

- Control de constantes.
  - Nevera, incubadores, estufa, manorreductores, %O<sub>2</sub>, temperaturas de superficie de campana y Tokai.
- Traslado de carros al quirófano y puesta en funcionamiento
- Preparación de los fungibles necesarios para ese día
  - Redondeado de pipetas cortas, estirado a la llama de pipetas largas, sacar de la nevera medio de vitrificar o desvitrificar, abrir catéteres de transferencia, preparado de placas para depositar los ovocitos durante las punciones...
- Manejo de cigotos y embriones
  - Control de fecundados y calidades embrionarias, cambio de placas de cultivo, preparación de placas de transferencia
- Quirófano
  - Transferencias y punciones con sus correspondientes procesados
- Procesado de muestras de semen

###### 1.2 Media mañana:

- Congelación de embriones no transferidos
- Desvitrificación de ovocitos
- Procesado de muestras de semen (inicio o continuación)
- Denudación de ovocitos y chequeo de estadio madurativo
- Acudir a consulta para asistir a las inseminaciones

###### 1.3 A partir de mediodía:

- Preparación de placas y medios de cultivo para el día siguiente
- FIV y microinyección
- Transferencias de embriones descongelados
- Limpieza de equipo de ICSI y campana de flujo
- Preparado de material de punciones del día siguiente

###### 1.4 Horario de tarde:

- Procesado de muestras de semen
- Registros y chequeos de los mismos,
- Control de resultados,
- Elaboración de documentos e informes,
- Llamadas a pacientes y gestiones varias

###### 1.5 Tareas no sujetas a horarios:

- Introducir datos de todos los procesos de laboratorio al programa informático
- Llamadas a pacientes
- Gestión de citaciones de pacientes
- Recepción de pedidos de materiales y medios
- Chequeo y reposición de los carros de quirófano
- Chequeo y reposición de los materiales de uso diario en cajones y armarios
- Limpieza de los fungibles y equipos utilizados cada día

- Micropipetas, selladora de pajuelas, objetivos de microscopio, cámara Makler, placas calefactadas
- Esterilización de material
  - Bloques de punción, puntas de pipetas automáticas, pipetas de vidrio, gradillas
- Preparación de las historias y hojas de trabajo de los ciclos en curso
- Revisión de las hojas de trabajo preparadas por otros.
  - Las hojas de trabajo son revisadas por un embriólogo diferente al que las ha preparado antes de que comience el tratamiento de esa paciente.
- Revisión de las historias de los tratamientos ya realizados pendientes de resultados
- Escaneo de las historias de los tratamientos con resultado conocido

## 2) TAREAS PERIÓDICAS

### 2.1 Tareas semanales:

- Limpieza de superficies externas de equipos
- Chequeo del nivel de nitrógeno de los bancos
- Chequeo del nivel de agua de los incubadores
- Pedido de medios y materiales

### 2.2 Tareas mensuales:

- Limpieza y esterilización del interior y las baldas de los incubadores

### 2.3 Tareas anuales:

- Chequeo del material biológico guardado en los bancos de nitrógeno

El que podamos describir más de cuarenta tareas diferentes, y éstas sean tan variadas y requieran su realización de manera simultánea, ayuda a entender por qué los directores de laboratorio deben estar capacitados para realizar muchas tareas diarias a la vez SIN DESCUIDAR las tareas de mantenimiento, de realizar pedidos... Esto nos anima a describir las tareas empleando otro punto de vista:

## LABORATORIO DE REPRODUCCION. QUIRON MADRID.

### 1) TAREAS DE PREPARACIÓN

#### 1.1 Preparación anual

- REVISIÓN ANUAL DE EQUIPOS: Solicitud de fecha
- COMPRAS Y MEJORAS: Estudio y planteamiento

#### 1.2 Preparación Mensual

- INCUBADORES Y ESTUFAS: Limpieza y esterilización
- MEDIOS Y FUNGIBLES: Previsión mensual según la carga de trabajo esperada

#### 1.3 Preparación Semanal

- OTROS MEDIOS Y FUNGIBLES: Pedido habitual

#### 1.4 Preparación Día anterior

- PLACAS Y MEDIOS DE CULTIVO: Preparar para el día siguiente
- HISTORIAS CLÍNICAS Y HOJAS DE TRABAJO: casos a realizar al día siguiente
- TRANSFERENCIAS: Citar a los pacientes

#### 1.5 Preparación Horas antes

- PUESTA EN MARCHA: Control de constantes, etc.
- Preparación en tiempo real de fungibles y medios tamponados

### 2) TAREAS A REALIZAR

#### 2.1 ACTIVIDAD en Semen

- Procesado y valoración de muestras y biopsias testiculares
- Congelación / descongelación
- Valoración de la supervivencia 24h
- Valoración de la morfología y vitalidad.

#### 2.2 ACTIVIDAD en Óvulos

- Recuperación de ovocitos de los líquidos foliculares
- Denudación y chequeo del estadio madurativo

- FIV / ICSI
- Vitricación de ovocitos

### 2.3 ACTIVIDAD en Embriones

- Valoración de la fecundación
- Cambio de placa de los embriones
- Valoración de morfología (cada día desde D+2 hasta D+7)
- Transferencia embrionaria
- Vitricación de los embriones viables no transferidos

### 3) ACTIVIDADES DE REVISIÓN

#### 3.1 Anual

- Revisión de los equipos del laboratorio
- Solicitud de limpieza general del laboratorio (paredes, etc.)
- Chequeo del material biológico guardado en los bancos de nitrógeno
- Registro y análisis de los datos de los ciclos realizados (SEF, ASEBIR, ESHRE...)

#### 3.2 Mensual

- Resultados y estadísticas de los ciclos llevados a cabo
- Actualización de consentimientos (material criopreservado)

#### 3.3 Semanal

- Comprobación del nivel de agua de los incubadores
- Chequeo del nivel de nitrógeno de los bancos de gametos y embriones
- Limpieza de superficies externas de equipos

#### 3.4 Fin del Día

- Limpieza y esterilización del material y equipos usados durante el día
- Revisión de los datos de los ciclos finalizados
- Llamadas a pacientes

## PARTE 2. CUALIDADES DE LAS TAREAS

Tras recabar la opinión de seis embriólogos, las cualidades fundamentales pueden agruparse en los siguientes cinco grupos:

TAREAS DE PREPARACION		Meticuloso					Habilidad física					Precavido					Empatía					Habilidad verbal									
		A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E					
<b>Anual</b>																															
1	REVISIÓN ANUAL DE EQUIPOS: Solicitud de fecha	3	4	4	4	4	3,8	0	0	0	0	0	0	5	5	5	5	4	4,8	0	1	0	0	0	0,2	2	0	3	2	0	1,4
2	COMPRAS Y MEJORAS: Estudio y planteamiento	5	4	4	5	4	4,4	0	0	0	0	0	0	3	5	5	5	4	4,4	3	2	0	1	1	1,4	5	0	3	4	3	3
<b>Mensual</b>																															
3	INCUBADORES Y ESTUFAS: Limpieza y esterilización	5	4	4	5v	5	4,6	3	0	0	1	0	0,8	3	4	4	3	4	3,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	MEDIOS Y FUNGIBLES: Previsión mensual según la carga de trabajo esperada	4	4	4	4	5	4,2	0	0	0	0	0	0	4	5	5	5	5	4,8	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0,4
<b>Semanal</b>																															
5	OTROS MEDIOS Y FUNGIBLES: Pedido habitual	4	4	4	4	4	4	0	0	0	0	0	0	4	5	5	5	5	4,8	0	0	0	0	0	0	3	0	2	3	3	2,2
<b>Día anterior</b>																															
6	PLACAS Y MEDIOS DE CULTIVO: Preparar para el día siguiente	5	5	5	5	5	5	5	3	4	5	4	4,2	5	5	5	5	4	4,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	HISTORIAS CLÍNICAS Y HOJAS DE TRABAJO: casos a realizar al día siguiente	5	5	5	5	5	5	3	3	4	3	0	2,6	3	5	5	4	5	4,4	0	0	3	0	0	0,6	0	0	0	0	0	0
8	TRANSFERENCIAS: Citar a los pacientes	0	4	4	3	5	3,2	0	3	4	0	0	1,4	4	3	4	4	4	3,8	5	5	5	5	4	4,8	5	5	5	5	5	5
<b>Horas antes</b>																															
9	PUESTA EN MARCHA: Control de constantes, etc.	5	4	4	4	4	4,2	3	2	3	2	0	2	3	2	3	2	4	2,8	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,2
10	Preparación en tiempo real de fungibles y medios tamponados	5	4	4	5	5	4,6	5	3	3	5	3	3,8	5	4	4	4	4	4,2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0,6

Tabla 1: Cualidades adecuadas a las tareas de preparación

- Meticulosidad.** (“Mantener el cuidado de los pequeños detalles”)
- Precavido.** (“Se comporta con cuidado para evitar un riesgo o daño”)
- Habilidades físicas** (“Precisión, atención, vista, rapidez, seguridad...”)
- Habilidades verbales** (“Comunicarse con eficacia y convencimiento”)
- Empatía** (“Capacidad de entendimiento, comprensión o comunión afectiva”)

Hemos pedido a cada embriólogo que valore de 1 a 5 cada cualidad necesaria para cada una de las tareas de preparación, y el resultado se refleja en la Tabla 1

Posteriormente, hemos pedido a los mismos embriólogos que valoren las

cualidades adecuadas a las tareas a realizar, y los resultados se exponen en la Tabla 2

Si valoramos en conjunto las 35 tareas que hemos descrito, las cualidades requeridas de un embriólogo serían las siguientes:

- Meticulosidad.** (“Mantener el cuidado de los pequeños detalles”
  - La más valorada, con 4,6 sobre 5. Es necesaria en TODAS las tareas.
- Precavido.** (“Se comporta con cuidado para evitar un riesgo o daño”)
  - La segunda más valorada, con 4,2 sobre 5.
  - Es también necesaria en TODAS las tareas.
- Habilidades físicas** (“Precisión, atención, vista, rapidez, seguridad...”)

- La tercera más valorada, con 3,4 sobre 5.
  - Es muy necesaria en las tareas a HACER (4,5) y poco para preparar o revisar.
- Habilidades verbales** (“Comunicarse con eficacia y convencimiento”)
    - Valorada globalmente poco (0,7 sobre 5) excepto en dos puntos fundamentales: a la hora de hablar con los pacientes (5) y al gestionar el pedido habitual (2,2)
  - Empatía** (“Capacidad de entendimiento, comprensión o comunión afectiva”)
    - La menos valorada (0,51) salvo para hablar con los pacientes (5) y solicitar la renovación de consentimientos de muestras o embriones criopreservados (1,6)



TAREAS A REALIZAR	Meticuloso A B C D E	4,9	Habilidad física A B C D E	4,5	Precavido A B C D E	4,2	Empatía A B C D E	0,28	Habilidad verbal A B C D E	0,12	
<b>Semen</b>											
11	Procesado y valoración de muestras y biopsias testiculares	5 5 5 5 5	5	5 4 4 5 4	4,4	3 4 5 4 5	4,2	0 0 4 0 0	0,8	0 0 0 0 0	0
12	Congelación / descongelación	5 5 5 5 5	5	5 4 4 5 4	4,4	3 4 5 4 5	4,2	0 0 4 0 0	0,8	0 0 0 0 0	0
13	Valoración de la supervivencia 24h	4 5 4 4 4	4,2	4 3 2 4 3	3,2	2 3 2 3 3	2,6	0 0 0 0 0	0	0 0 0 0 0	0
14	Valoración de la morfología y vitalidad.	5 5 4 5 5	4,8	3 3 5 5 3	3,8	2 3 3 3 5	3,2	0 0 0 0 0	0	0 0 0 0 0	0
<b>Óvulos</b>											
15	Recuperación de ovocitos de los líquidos foliculares	5 5 5 5 5	5	5 4 5 5 4	4,6	5 4 5 4 5	4,6	0 0 0 0 0	0	0 0 0 0 0	0
16	Denudación y chequeo del estadio madurativo	5 5 5 5 5	5	5 4 5 5 5	4,8	5 4 5 4 5	4,6	0 0 0 0 0	0	0 0 0 0 0	0
17	FIV / ICSI	5 5 5 5 5	5	5 5 5 5 5	5	5 5 5 4 5	4,8	0 0 0 0 0	0	0 0 0 0 0	0
18	Vitrificación de ovocitos	5 5 5 5 5	5	5 5 5 5 5	5	5 5 5 5 5	5	0 0 0 0 0	0	0 0 0 0 0	0
<b>Embriones</b>											
19	Valoración de la fecundación	5 5 5 5 5	5	5 4 5 5 1	4	4 4 4 4 5	4,2	0 0 0 0 0	0	0 0 0 0 0	0
20	Cambio de placa de los embriones	5 5 5 5 5	5	5 4 5 5 5	4,8	4 5 4 4 5	4,4	0 0 0 0 0	0	0 0 0 0 0	0
21	Valoración de morfología (cada día desde D+2 hasta D+7)	5 5 5 5 5	5	5 5 5 5 1	4,2	4 4 0 4 5	3,4	0 0 0 0 0	0	0 0 0 0 0	0
22	Transferencia embrionaria	5 5 5 5 5	5	5 5 5 5 5	5	5 5 4 5 5	4,8	0 0 3 0 4	1,4	0 0 4 0 4	1,6
23	Vitrificación de los embriones viables no transferidos	5 5 5 5 4	4,8	5 5 5 5 5	5	4 5 4 5 5	4,6	0 0 3 0 0	0,6	0 0 0 0 0	0

### PARTE 3. LOS DIFERENTES PUESTOS DE TRABAJO

¿Todos los embriólogos deben ser iguales? Evidentemente no, ya que cada laboratorio es diferente y cada puesto de trabajo es diferente a los demás.

No obstante, podemos diferenciar cuatro puestos de trabajo diferentes:

#### 1) DIRECTOR DEL LABORATORIO

Tareas específicas:

- Coordinación y organización de los trabajadores del laboratorio
- Comunicación con el equipo de dirección de la unidad y de la clínica
- Establecimiento de los protocolos de trabajo

- Compras, mejoras y mantenimiento anual de los equipos del laboratorio
- Manejo jurídico de material criopreservado
- Información a pacientes en situaciones difíciles

Cualidades:

- LIDER: Capacidad de liderazgo, de decisión, de resolución, anticipación, precaución...
- COMPROMISO: responsabilidad, disciplina, disponibilidad...
- RELACIÓN: de comunicación, capacidad de aprendizaje, empatía...
- EQUIPO: de delegación, trabajo en equipo, compañerismo...
- HUMANO: fomento de la excelencia laboral, motivación...
- HÁBIL: destreza manual y visual...

#### 2) SUBDIRECTOR

Tareas específicas:

- Organización del trabajo diario.
- Control y revisión de equipos y bancos de nitrógeno de forma rutinaria.
- Pedidos de material fungible y medios de cultivo.
- Análisis de datos y resultados.
- Supervisión de los análisis y técnicas de rutina en Reproducción Asistida.
- Información a pacientes especiales.

Cualidades:

- SISTEMÁTICO: Organización, previsión, anticipación.
- RESOLUTIVO: Resolución, destreza manual y visual, improvisación.
- COMPROMETIDO: Compromiso, responsabilidad.

REVISAR		Meticuloso 4,5					Habilidad física 1,2					Precavido 4,1					Empatía 0,6					Habilidad verbal 0,6									
		A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E					
<b>Anual</b>																															
24	Revisión de los equipos del laboratorio	3	5	5	4	4	4,2	0	0	0	0	0	0	5	5	5	5	4	4,8	0	1	0	0	0	0,2	2	0	0	1	0	0,6
25	Solicitud de limpieza general del laboratorio (paredes, etc.)	5	3	5	4	4	4,2	2	0	0	0	0	0,4	1	5	5	4	4	3,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	Chequeo del material biológico guardado en los bancos de nitrógeno	5	5	5	5	5	5	5	0	4	5	4	3,6	5	5	5	4	5	4,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	Registro y análisis de los datos de los ciclos realizados (SEF, ASEBIR, ESHRE...)	5	5	5	5	5	5	0	4	3	0	0	1,4	1	5	4	4	5	3,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Mensual</b>																															
28	Resultados y estadísticas de los ciclos llevados a cabo	5	5	5	5	5	5	0	3	0	0	0	0,6	5	4	3	4	5	4,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	Actualización de consentimientos (material criopreservado)	5	5	5	5	5	5	0	3	0	0	0	0,6	5	4	3	5	5	4,4	0	0	4	4	0	1,6	0	0	5	5	0	2
<b>Semanal</b>																															
30	Comprobación del nivel de agua de los incubadores	3	5	5	4	4	4,2	2	3	0	1	0	1,2	3	4	5	4	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	Chequeo del nivel de nitrógeno de los bancos de gametos y embriones	5	5	5	5	5	5	2	3	0	2	0	1,4	3	5	5	4	5	4,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	Limpieza de superficies externas de equipos	3	5	4	3	4	3,8	2	2	3	2	0	1,8	2	4	0	2	5	2,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Fin del Día</b>																															
33	Limpieza y esterilización del material y equipos usados durante el día	3	5	4	4	5	4,2	3	2	2	2	0	1,8	3	4	5	3	5	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	Revisión de los datos de los ciclos finalizados	5	5	5	5	5	5	0	4	0	0	0	0,8	5	4	2	5	5	4,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	Llamadas a pacientes	3	5	5	3	3	3,8	0	4	0	0	0	0,8	4	4	2	4	4	3,6	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Tabla 2: Cualidades adecuadas a las tareas de preparación

- EQUIPO: Trabajo en equipo, compañerismo, empatía.

### 3) EMBRIÓLOGO

Tareas específicas:

- Realización de los análisis y técnicas de rutina en Reproducción Asistida.
- Información rutinaria a pacientes.
- Realización de seminogramas.

Cualidades

- HABILIDOSO: Destreza manual y visual, capacidad de aprendizaje.
- SISTEMÁTICO: Organización, responsabilidad, compromiso.
- EQUIPO: Empatía, compañerismo, trabajo en equipo.

### 4) TÉCNICO DE LABORATORIO

Tareas específicas:

- Preparación de placas y medios de cultivo.
- Elaboración de las hojas de trabajo del laboratorio.
- Esterilización del material usado en el día.

Cualidades:

- METICULOSO: Destreza manual y visual.
- SISTEMÁTICO: Organización, responsabilidad, compromiso.
- EQUIPO: Compañerismo, trabajo en equipo.

### PARTE 4. LAS CUALIDADES DE LOS PUESTOS DE TRABAJO

¿Cuáles son entonces las cualidades fundamentales para cada puesto?

Aunque es subjetivo y discutible, nuestra opinión es la siguiente:

El Director de Laboratorio debe destacar en LIDERAZGO. Debe estar atento a todo, pues debe interesarse por las personas (su situación técnica, laboral, personal y emocional) por los resultados obtenidos (tasas de embarazo, de fecundación, de supervivencia, de errores...) y por los aspectos económicos, laborales, inversiones, obras, contrataciones... En todos estos ámbitos su papel es doble:

- debe analizar el pasado (resultados, trayectoria, decisiones, consecuencias...) para proponer modificaciones en la situación presente
- debe analizar constantemente la situación presente para proponer los cambios que lleven a un mejor futuro.

El Subdirector de laboratorio debe destacar en ORGANIZACIÓN. Debe conseguir que un grupo de personas completamente diferentes unas a otras trabajen como si fuesen una sola. Debe mantener unos procedimientos sistemáticos, repetibles y estables todas y cada una de las veces, y que detecten y reparen los errores humanos antes de llegar a ser trascendentes. Debe tener una gran capacidad de improvisación para que todo siga igual aunque algo grave haya sucedido.

El embriólogo debe destacar en HABILIDADES PERSONALES. Debe realizar con facilidad, rapidez y fiabilidad una gran cantidad de tareas diferentes, pero debe realizarlo según un método estable y homogéneo, en armonía y unión a los demás embriólogos como si fueran una sola persona.

El Técnico debe destacar en METICULOSIDAD. El orden, la fiabilidad y la precisión son sus herramientas fundamentales. Debe saber trabajar sin

distraer a otros, así como realizar sus tareas con rapidez y limpieza.

## CONCLUSIONES GENERALES

1. Las cualidades técnicas y personales son específicas de cada puesto de trabajo.

*“El mejor bailarín no será siempre el mejor coreógrafo”*

2. La selección de personal y la decisión sobre su papel en el equipo solo serán acertadas al tener en cuenta tanto sus capacidades técnicas como sus cualidades personales.

*“Ser amable es más importante que tener razón. A veces lo que la gente necesita NO es una mente brillante que hable, sino un corazón especial que escuche”*

3. El tener buenas aptitudes para un puesto concreto es necesario, pero ni mucho menos suficiente: su capacidad de adaptación al entorno y al resto del equipo son esenciales.

## ¿QUÉ ESPERA ENTONCES UN GINECOLOGO DE UN EMBRIOLOGO?

1. Que sea **capaz**: tenga las destrezas adecuadas a su puesto.

2. Que sea **sistemático**: organizado, preciso y metódico.
3. Que sea **tenaz**: que mantenga vivos los proyectos que le encarguen.
4. Que sea **innovador**: el futuro está aquí cada día.
5. Que sea **prudente**: anticiparse y prevenir.
6. Que sepa **improvisar**: que todo siga igual aunque algo haya cambiado.
7. Que sea **flexible**: capaz de modificar continuamente para mejorar.
8. Que cree **BUEN AMBIENTE**.
9. Que **viva con armonía**: que triunfe también en su vida personal y familiar.
10. Y sobre todo: **¡Que sea feliz en su puesto! ...y haga feliz a los que le rodean.**

¿CUMPLIMOS ALGUNO TODAS LAS CUALIDADES?

Evidentemente no, pero es nuestra meta.

¿CONOCEMOS BIEN AL MENOS NUESTRAS VIRTUDES Y DEFECTOS?

Al menos así nos ponemos disposición a poder mejorar...

*“EL OBJETIVO PUEDE QUE SEA INALCANZABLE, PERO ES IRRENUNCIABLE”*

## ¿QUÉ ESPERA UN EMBRIOLOGO CLÍNICO DE UN GINECÓLOGO?

Fernando J. Prados  
Hospital Universitario Madrid-Montepríncipe. Madrid.  
[fernandoprados@gmail.com](mailto:fernandoprados@gmail.com)

La gran mayoría de los profesionales de titulación universitaria superior en los centros de FIV está formada por dos especialidades clínicas: Embriólogos clínicos y ginecólogos. La combinación de conocimientos y habilidades de ambos grupos de especialistas sanitarios es una de las claves de la excelencia de una unidad de Reproducción Humana Asistida. La interacción entre embriólogos clínicos

y ginecólogos es constante tanto a nivel profesional como personal. En este trabajo se pretenden exponer algunos comportamientos del ginecólogo que contribuirían a optimizar su interacción con el embriólogo clínico.

1. Un embriólogo clínico espera que el ginecólogo le ayude a maximizar las posibilidades de éxito de los tratamientos de FIV.

En este sentido, el embriólogo espera que el ginecólogo:

- Le proporcione buenos oocitos
- Mantenga en perfectas condiciones a la paciente
- Prepare buenos endometrios bien sincronizados
- Transfiera bien los embriones

Por supuesto que, en gran medida, todos estos requerimientos están muy

condicionados por la propia paciente, o por la donante en su caso. También el servicio de anestesia tiene algo que decir en cuanto a los dos primeros conceptos. Por lo tanto, quizá la manera más exacta de definir lo que se espera del ginecólogo sería: "Que obtenga los mejores oocitos posibles manteniendo en las mejores condiciones posibles a la paciente. Que estimule a la paciente a generar el mejor endometrio que su organismo pueda producir. Que transfiera los embriones con la mayor eficacia y delicadeza posibles".

El embriólogo clínico dedica su esfuerzo a producir, cuidar y seleccionar los mejores embriones, de modo que, si el ginecólogo cumple con los anteriores requisitos le facilita la tarea y le ayuda a obtener la máxima satisfacción profesional que es acabar teniendo a una mayoría de embriones convertidos en niños jugando en el parque.

2. Un embriólogo clínico espera que el ginecólogo mantenga un diálogo abierto y fluido con él.

No siempre el ginecólogo está disponible para hablar con el embriólogo. No es adecuado interrumpir una consulta. El problema lo suele generar el ginecólogo ya que el embriólogo suele tener menos ocasiones en las que no se le puede interpelar. Esto no significa que en cualquier ocasión se le pueda apartar de su tarea para dialogar con el ginecólogo, pero es fácil que al menos pueda responder en cualquier ocasión al ginecólogo que se asoma al laboratorio.

3. Un embriólogo clínico espera que el ginecólogo trabaje en el centro de FIV con la máxima dedicación.

No se puede dominar un tema tan complejo como la FIV sin dedicarle la máxima atención. Con cierta frecuencia, el ginecólogo no tiene dedicación exclusiva a la FIV. Compagina su labor en reproducción asistida con otras tareas de ginecología y obstetricia. Tiene consultas de ginecología general, guardias nocturnas, quirófano, lleva embarazos, asiste partos, etc. Pero además, no se puede gestionar un

centro de FIV con eficacia si nos vemos condicionados por los horarios de segundos trabajos del personal de la clínica.

Esta dispersión laboral de numerosos ginecólogos contrasta vivamente con la total dedicación a la reproducción asistida del embriólogo clínico. En muchas ocasiones el embriólogo tiene que compensar la falta de dedicación del ginecólogo con la suya propia, desde adaptar los horarios de los procedimientos a su agenda hasta tener que atender las dudas sobre el tratamiento hormonal de los pacientes.

Lo habitual es que las labores que se salen de lo puramente clínico recaigan sobre el embriólogo antes que sobre el ginecólogo. Tan sólo en algunos centros de tamaño suficientemente grande se dispone del adecuado personal auxiliar para ocuparse de tareas como gestión de almacén y pedidos, archivo, recepción de material, mantenimiento, etc.

4. Un embriólogo clínico espera que el ginecólogo se implique al máximo en la obtención de los mejores resultados.

El embriólogo se implica. El embriólogo pone todo su conocimiento, esfuerzo y habilidades a contribución para lograr la máxima tasa de éxito en la FIV y, en justa reciprocidad, espera que el ginecólogo haga lo mismo.

La falta de dedicación exclusiva puede llevar aparejada una falta de implicación en la eficacia del centro de FIV. Si al concluir la tarea clínica en el centro de reproducción asistida, el ginecólogo ha de apresurarse para llegar a tiempo a su consulta de obstetricia no es de extrañar que dedique menos atención de la debida a recapitular sus acciones y revisar las estadísticas derivadas de la última posible mejora en la técnica de la transferencia embrionaria que se ha introducido en su clínica. Nuestra especialidad clínica está en continuo desarrollo, lo cual obliga a revisar continuamente los resultados de nuestro trabajo.

Sin la total implicación del ginecólogo, el embriólogo clínico tiene muy

complicado llevar a término adecuados controles de calidad. Los múltiples factores que afectan a la eficacia de la FIV deben ser considerados en conjunto y no se pueden extraer conclusiones aceptables derivándolas de análisis ceñidos a la parte del laboratorio.

5. Un embriólogo clínico espera que el ginecólogo respete sus competencias y responsabilidades profesionales.

La FIV es una especialidad clínica multidisciplinar. Profesionales de variada formación deben aportar sus diversos conocimientos y habilidades para conseguir los mejores resultados. Es necesario que las tareas, competencias y responsabilidades de cada profesional estén correctamente distribuidas para que el equipo produzca el mayor rendimiento.

La responsabilidad del trabajo de embriólogo clínico es muy elevada. Su paciente es el embrión humano, el cual presenta una extrema sensibilidad que no tiene ni remota comparación con la de los pacientes de ninguna otra especialidad médica. Por tanto el margen de error del embriólogo clínico es mínimo y su nivel de responsabilidad máxima. El ginecólogo debe reconocer y respetar las responsabilidades del embriólogo clínico.

Uno de los requisitos fundamentales para conseguir una relación óptima entre los miembros de cualquier equipo es el respeto mutuo. La relación entre el embriólogo clínico y el ginecólogo fracasa si uno de los dos considera que su nivel profesional es superior al del otro.

En numerosas ocasiones ocurre que el ginecólogo no es tan sólo el compañero del embriólogo en el centro de FIV, sino que además es su jefe. En estos casos, existen otros temas que el embriólogo clínico debe esperar del "Ginecólogo-Jefe".

6. El embriólogo clínico espera que el ginecólogo-jefe le proporcione unas condiciones laborales justas y acordes con su nivel académico, con su formación especializada y con el nivel



de responsabilidad que lleva aparejada su labor.

Se debe destacar que la formación académica y práctica específica que se necesita y que tienen una gran mayoría de los embriólogos clínicos es la mayor de todos los profesionales que componen un centro de FIV. A la titulación universitaria superior en ciencias biomédicas que tiene todo embriólogo clínico hay que sumar la realización de un máster universitario sobre reproducción asistida que posee un elevado porcentaje de embriólogos clínicos. Además de estos títulos académicos oficiales, gran parte de los embriólogos clínicos españoles están en posesión de dos prestigiosos títulos que acreditan su competencia específica en Embriología Clínica, uno de ellos es el otorgado por ASEBIR y el otro el que otorga la ESHRE. Ningún otro profesional de reproducción asistida dispone de un sistema de acreditación específica comparable.

Como ya dijimos, la elevada responsabilidad que recae sobre el trabajo del embriólogo clínico debe ser respetada y tenida en muy en cuenta. Las condiciones en que el embriólogo ejerce su labor deben permitirle hacer frente a sus responsabilidades con garantías.

Ni sobrecargas de trabajo ni presión de horarios son admisibles cuando está en juego la salud embrionaria.

El salario del embriólogo clínico debe ser acorde a su nivel académico, a su alto grado de especialización y a su elevada responsabilidad dentro del centro de FIV.

7. El embriólogo clínico espera que el ginecólogo-jefe le proporcione los medios adecuados para realizar un trabajo de máxima calidad.

Como ya dijimos, obtener unos buenos resultados en FIV es una de las grandes satisfacciones que puede obtener el embriólogo clínico. Para alcanzar buenos resultados no sólo se necesita que haga bien su trabajo y que el ginecólogo haga bien el suyo, también hace falta disponer de un equipamiento y de un material fungible complejo, específico y caro. Si el ginecólogo-jefe no consigue que estos medios materiales estén disponibles para el laboratorio de FIV, el embriólogo sufrirá la frustración de no poder aprovechar adecuadamente su propia capacidad profesional.

8. El embriólogo clínico espera que el ginecólogo-jefe facilite su formación continuada.

El embriólogo clínico es un científico. La Embriología Clínica es una ciencia joven y en rápida evolución. El embriólogo necesita actualizar constantemente sus conocimientos para poder mantener el nivel de competencia profesional. Esta actualización de conocimientos se debe producir mediante el estudio de la literatura científica especializada y mediante la interacción con expertos de otros centros.

El ginecólogo-jefe debe proporcionar al embriólogo los medios necesarios para que pueda actualizar sus conocimientos e incluso debe exigirle esa actualización. Entre esos "medios necesarios" figura el acceso a las publicaciones científicas más relevantes relacionadas con la FIV y la asistencia a congresos y reuniones científicas nacionales e internacionales.

En conclusión, el embriólogo clínico espera que el ginecólogo no sólo no limite sino que facilite su desarrollo profesional en la medida de sus posibilidades. Que le ayude a aprovechar todo su potencial para obtener las mayores tasas de éxito en FIV. Que colabore para facilitar sus tareas. En definitiva, que forme un verdadero equipo con él y el resto de profesionales implicados en la FIV para disfrutar plenamente de un trabajo apasionante.

## REDUCIR LOS ERRORES EN FIV. IVF WITNESS 2 AÑOS DESPUÉS

Xavier Orriols Brunetti  
The Bridge Centre (Londres, Reino Unido)  
[x.brunetti@thebridgecentre.co.uk](mailto:x.brunetti@thebridgecentre.co.uk)

### INTRODUCCIÓN

Los procedimientos médicos y quirúrgicos tienen como principal finalidad mejorar el bienestar del paciente tratado y en consecuencia el de su entorno afectivo. Pero un error en dicho tratamiento podría provocar un resultado perjudicial; este aspecto se vuelve especialmente sensible y relevante si el error se produce durante un tratamiento de reproducción asistida. La consecuencia del error no solamente afectaría a la paciente sino también al niño o niña nacido como resultado de ese tratamiento. Para evitar dichos errores la normativa legal de algunos países de nuestro entorno (Reino Unido-UK- y Holanda) requieren la presencia de un segundo embriólogo (el testigo o *witness* en inglés) para identificar los gametos y/o embriones durante todos los procedimientos de un ciclo de fecundación *in vitro* (FIV). Asimismo, las recomendaciones de la *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) establecen que la doble identificación debería producirse al menos durante los pasos de inseminación, transferencia embrionaria, criopreservación y descongelación (Gianaroli et al., 2000; Human Fertilisation and Embryology Authority, 2009).

En el año 2010, *The Bridge Centre* (Londres, UK) instaló y validó un sistema de *witnessing* electrónico (*RI Witness™*, Research Instruments, UK) para sustituir la mayor parte de pasos de *witnessing* manual obligatorios en el Reino Unido. *RI Witness™* emplea tecnología de identificación por radiofrecuencia (RFID en sus siglas en inglés) para rastrear y registrar muestras de pacientes en cada proceso de FIV. Las campanas están equipadas con lectores de RFID y pantallas táctiles que identifican y registran cada acción efectuada. Las etiquetas autoadhesivas RFID son colocadas en todos los tubos

y placas de cultivo, permitiendo a los lectores registrar el contenido y la identidad del paciente.

Este estudio tiene como objetivos (i) confirmar los datos obtenidos inicialmente y (ii) comparar dichos datos con los de otro laboratorio de FIV.

### MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio incluye datos de *The Bridge Centre* (TBC), que fueron comparados con los resultados de *London Women's Clinic* en Gales (Swansea/Cardiff, UK (LWC)). LWC se trasladó de Swansea a un nuevo laboratorio en Cardiff en octubre 2012. Se han incluido todos los tratamientos efectuados entre diciembre 2010 y abril 2013 (ej. en fresco, DGP, criotransferencias e inseminación artificial). Con los datos obtenidos se calcularon los siguientes parámetros:

**1. Tasa de Error:** manipulación de placas y/o tubos de distintos pacientes en una misma área de trabajo de forma simultánea. Dichos errores se subdividen en:

**a) Forzado:** fallos en la configuración inicial del sistema (ej. ciclos que incluyen donación de ovocitos)

**b) Uso:** etiquetas situadas en la cercanía de las estaciones lectoras y que fueron asignadas por error a pacientes aun cuando estas no se encontraban adheridas a ninguna placa o tubo

**c) Real:** error humano provocado por la introducción de dos placas o tubos de distintos pacientes en tratamiento

**4. Tasa de Asignación manual:** acciones que requirieron la identificación manual de etiquetas RFID por parte de un embriólogo y un segundo witness. La asignación puede ser considerada como:

**a) Error humano:** asignación consecuencia de un uso incorrecto de sistema de *witnessing* (ej. en el sistema se indica que se va a proceder a descongelación de semen cuando en realidad se van a descongelar embriones

**b) Error del sistema:** asignación producida por un fallo del sistema no imputable a un error humano (ej. fallo de la etiqueta RFID o a una configuración inicial errónea del sistema.

**c) Correcta:** asignación manual debida a procedimientos fuera de los protocolos habituales (ej. retorno de un embrión a una placa de cultivo tras cancelar la transferencia embrionaria), caída del servidor o a cortes en el suministro eléctrico

**4. Tasa de Inconveniencia:** acciones que requieren la intervención de un segundo embriólogo debido, por ejemplo, a la rotura de una etiqueta RFID; engloban asignaciones manuales y errores.

### RESULTADOS

Los datos para el periodo de estudio de ambos centros se encuentran resumidos en la *Tabla I*. Estos se han dividido para el periodo global y por paciente. TBC efectuó un número mayor de ciclos que LWC (4231 y 1817 respectivamente). El número de etiquetas empleadas por ciclo fue equivalente en ambos centros a pesar de que el número de pasos de *witnessing* por paciente en LWC fue un 20% superior a TBC.

La tasa de asignación manual de TBC fue superior a la de LWC (0.782% y 0.397%), aunque la distribución en función del tipo de asignación manual fue similar. Cuando se analizó la evolución de la tasa de asignación manual en TBC (*Figura 1*) se observó una disminución de las asignaciones producidas por un

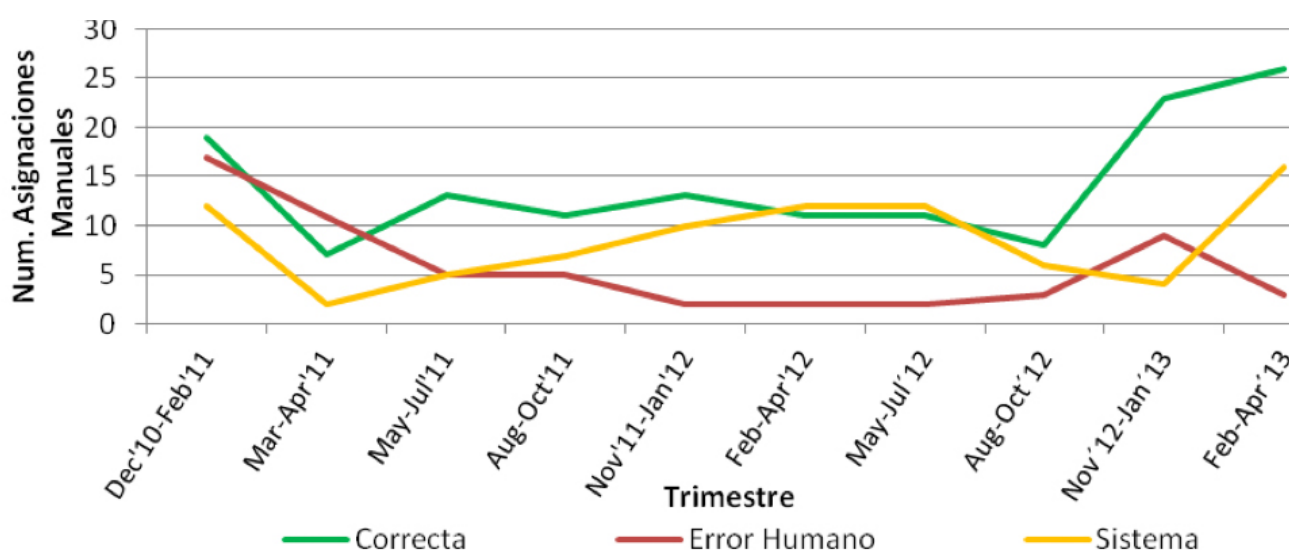


Figura 1. Evolución de la asignación manual de etiquetas RFID en TBC.

descuido humano y en consecuencia un aumento de asignaciones válidas o debidas a fallos del sistema.

La tasa de error en TBC fue ligeramente inferior (0.201%) a la de LWC (0.287%), y la distribución en función del tipo de error fue distinta en ambos centros.

En TBC la mayor parte de los errores se dividieron a partes iguales entre forzados (44%) y reales (48%), mientras que en LWC la mayor parte de los errores fueron reales (81%). Si estos datos son interpretados desde un punto de vista práctico, en TBC se introdujeron placas y/o tubos de distintos pacientes

en 1 de cada 1000 ocasiones, mientras que en LWC estas situaciones de riesgo aumentaron a 1 de cada 450.

En ambas clínicas, la tasa de error real (Figura 2) sufrió una disminución generalizada con el tiempo, con la excepción de los meses de junio y julio donde se observa un repunte en la tasa de error real. En LWC se observó una considerable disminución en la tasa de error real a partir de octubre 2012, trimestres en los cuales la actividad se desarrolló en las nuevas instalaciones de Cardiff.

Finalmente, la tasa de inconveniencia en LWC fue ligeramente menor (0.680%) a la de TBC (0.980%); es decir, en LWC la intervención de un segundo embriólogo fue necesaria una vez cada 150 procedimientos mientras que en TBC esta cifra aumentó a 1 de cada 100 procedimientos.

## DISCUSIÓN

Los datos obtenidos sugieren que los sistemas de *witnessing* electrónicos son aptos para laboratorios con distintos cargas de trabajo, reduciendo el riesgo de error durante los procedimientos, a la vez que ayudan a disminuir el volumen de trabajo y las distracciones que el *witnessing* manual provocaría. A pesar de que LWC es un laboratorio con menor número de ciclos, sus procedimientos incluyeron más etapas (ej. la preparación de las muestras

	The Bridge Centre		London Women's Clinic - Wales	
	Paciente	Total	Paciente	Total
<b>Ciclos totales</b>	-	4231	-	1817
<b>Ciclos por mes</b>	-	141	-	61
<b>Etiquetas RFID usadas</b>	9.5	40051	9.2	16660
<b>Pasos de witnessing</b>	8.3	34934	9.9	18004
<b>Tasa Asignación manual</b>	~1/130	0.782 %	~1/250	0.397 %
Error humano	-	21%	-	11%
Error del Sistema	-	31%	-	24%
Correcta	-	51%	-	65%
<b>Tasa Error</b>	~1/500	0.201 %	~1/350	0.287 %
Forzado	-	44%	-	6%
Uso	-	8%	-	12%
Real	-	48%	-	81%
<b>Tasa Error real</b>	~1/1000	0.096 %	~1/450	0.232 %
<b>Tasa Inconveniencia</b>	~1/100	0.980 %	~1/150	0.680 %
<b>Tasa fallo etiqueta</b>	~1/1000	0.099 %	~1/7500	0.013 %

Tabla I. Resultados de *witnessing* electrónico para el periodo diciembre 2010 - abril 2013.

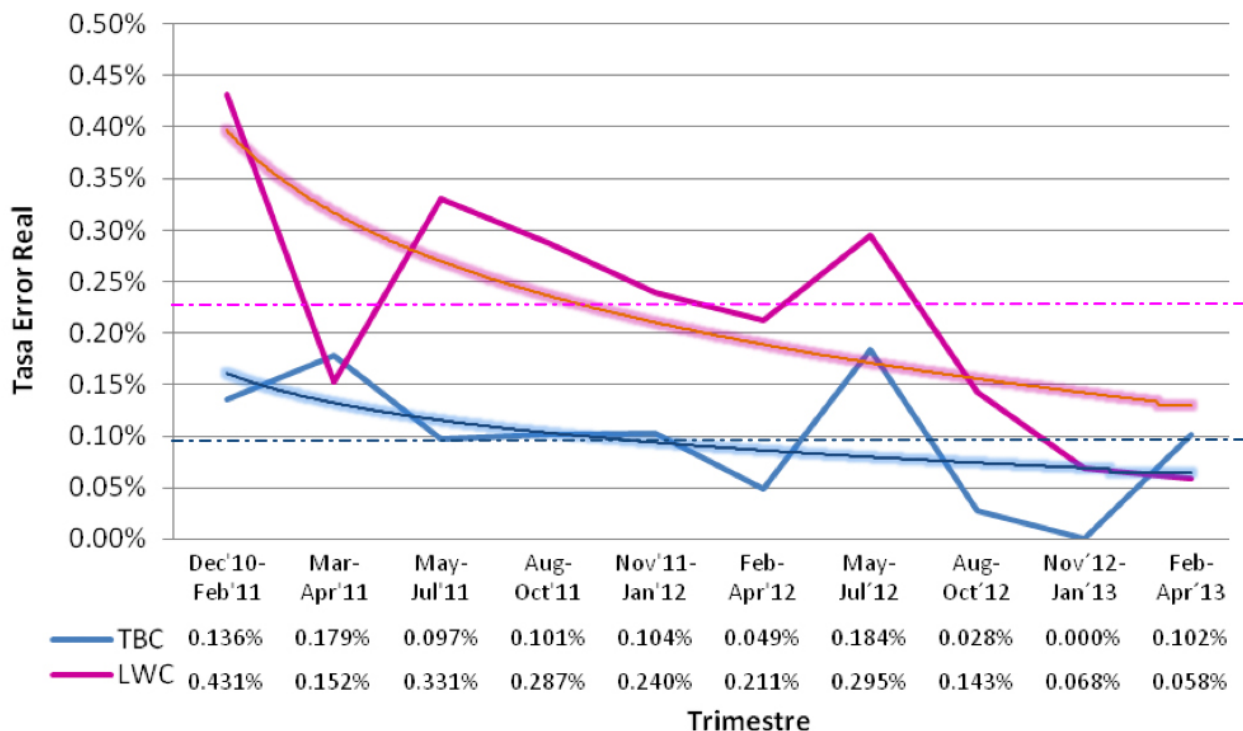


Figura 2. Evolución de la Tasa de error real para TBC y LWC.

de semen consta de un tercer paso de *swim-up* que en TBC no se realiza).

La evolución de la asignación manual de etiquetas RFID en TBC indicaría la existencia de una curva de aprendizaje y de optimización del sistema. Esta disminución tiempo-dependiente también se observó en el número de errores reales para las dos clínicas; en ambos casos las líneas de tendencia indicarían una tasa de error real situada entre 0.06% y 0.15% en función del laboratorio. Estos datos se correlacionarían favorablemente con los obtenidos en anteriores estudios que situaban la tasa de error real de un laboratorio de FIV alrededor del 0.10% (Orriols Brunetti et al., 2011; Orriols Brunetti et al., 2012). El repunte observado en el periodo de junio-julio podría explicarse por el menor número de personal disponible durante los meses de verano.

La mayor tasa de inconveniencia observada en TBC respecto a LWC

podría deberse en primer lugar al mayor volumen de pacientes tratados y en segundo lugar a la mayor complejidad de los procedimientos llevados a cabo en TBC (ej. biopsia de corpúsculo polar 1 y 2 o biopsia de trofoectodermo).

## CONCLUSIÓN

El sistema de *witness* electrónico ha demostrado ser una herramienta útil en el laboratorio de reproducción asistida que ayuda a prevenir posibles errores, aportando seguridad tanto a pacientes como a embriólogos. Además, los datos obtenidos en LWC sugieren que además de la instalación sistemas de *witnessing* electrónico, un laboratorio moderno, correctamente equipado y bien organizado serían elementos clave que contribuirían también a reducir el riesgo de errores. *RI Witness* ayuda asimismo a estandarizar la manera de trabajar, permite la introducción de datos en tiempo real desde las estaciones de trabajo facilitando la transición a

laboratorios libres de papel, simplifica las tareas diarias del laboratorio y facilita la obtención de datos para el control de calidad interno.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Gianaroli L., Plachot M, van Kooij R, Al-Hasani S, Dawson K, De Vos A, et al. ESHRE guidelines for good practice in IVF laboratorios. *Human Reproduction* 2000; 15(10):2241-2246.

Human Fertilisation and Embryology Authority (HFEA). (2009). 8th Code of Practice.

Orriols Brunetti, X. Reducir los errores en FIV: *witnessing* electrónico. VI Congreso ASEBIR; 2011, Octubre 5-7; Girona, España. p. 94

Orriols Brunetti, X. Measuring human error in the IVF laboratory using an electronic *witnessing* system. XXI Nordic Fertility Society Meeting; 2012, Agosto 6-8; Helsinki, Finlandia.



## EL DGP MOLECULAR COMBINADO CON MICROARRAYS DE CGH: UNA NUEVA ESTRATEGIA DIAGNÓSTICA

Xavier Vendrell, Rosa Bautista-Llàcer, Trinitat Alberola, Cristina Sánchez-Matamoras, Merche Pardo, Elena García-Mengual, Empar Raga. Unidad de Genética Reproductiva. Sistemas Genómicos S.L. Parc Tecnològic de València. Ronda G. Marconi 6, 46980, Paterna (València). [javier.vendrell@sistemasgenomicos.com](mailto:javier.vendrell@sistemasgenomicos.com)

### INTRODUCCIÓN

La fecundación *in vitro* en combinación con el diagnóstico genético de células embrionarias, obtenidas mediante biopsia, es una estrategia consolidada para evitar la transmisión de enfermedades monogénicas a la descendencia. Esta estrategia presenta una limitación importante, y es que no ofrece información sobre la ploidía del embrión. El factor limitante es la escasa cantidad de ADN que se puede encontrar en una célula embrionaria diploide única, equivalente a unos 6 pg. Esto complica mucho la ejecución simultánea de diferentes técnicas. Desde el punto de vista genético, la información sobre la ploidía del embrión resulta capital. Está bien establecido que los embriones humanos en estadios preimplantación exhiben altas tasas de aneuploidías. Algunos autores refieren tasas de aproximadamente un 65% de aneuploidía en embriones en día 3 (Gutiérrez-Mateo, et al., 2011). Además, en algunos casos las características genéticas de la pareja obligan al estudio genético combinado. Por ejemplo, casos en los que coincide una alteración citogenética con una enfermedad monogénica.

El estudio conjunto ha sido abordado mediante diferentes estrategias. La combinación de técnicas citogenéticas fluorescentes (FISH: *fluorescence in situ hybridization*) y técnicas moleculares (basadas en PCR, *polymerase chain reaction*), en dos células distintas, biopsiadas en estadio de división (Lee et al., 2006), ha sido una de las propuestas. Cada célula se procesa de forma distinta. Las células que se van a analizar mediante FISH se fijan en un portaobjetos y las que se analizan por técnicas moleculares se aíslan en tubos de PCR. Esta aproximación tiene una clara limitación, y es el efecto deletéreo de la biopsia de dos células sobre el

potencial de implantación del embrión (Goossens V et al., 2008; De Vos et al., 2009). En este sentido la doble biopsia no es una práctica recomendada actualmente (Harton, et al., 2011). Asimismo, la biopsia de dos células está condicionada por el número de células en el momento de la biopsia. En caso que el estado de división no permita la biopsia de dos células, se prioriza el estudio de la enfermedad monogénica.

Otra de las estrategias es lo que se conoce como la "rebiopsia". Esta práctica consiste en realizar los estudios de forma secuencial. En un primer momento se analiza el primer y segundo corpúsculo polar para obtener información sobre el trastorno monogénico mediante técnicas moleculares. Los embriones se vuelven a biopsiar en estadio de división (día 3) para analizar las aneuploidías de un número limitado de cromosomas, mediante técnicas fluorescentes (Magli et al., 2004; Verlinsky et al., 2006). La máxima limitación de esta estrategia es que resulta difícil de compatibilizar con el esquema general de DGP en la gran mayoría de centros. Habitualmente, los centros de FIV externalizan el análisis genético a un centro especializado, y en muchas ocasiones, un experto se desplaza al laboratorio para efectuar la biopsia. Esto resulta complejo de coordinar y muy costoso en los casos de rebiopsia. Además, tal como asumen los autores, es difícil establecer el efecto de la manipulación adicional del embrión. Por otra parte, también se ha propuesto el estudio simultáneo de una enfermedad monogénica y la trisomía del cromosoma 21, sobre la misma célula aplicando técnicas de PCR multiplex (Piyamongkol et al., 2006). A pesar que es un método rápido y sensible, resulta limitado en relación con la aneuploidía total. Finalmente, las recientes técnicas de CGHa (*comparative genome hybridization arrays*) han permitido

desarrollar el estudio en células del trofoblasto para las dos indicaciones simultáneamente, mediante un *array* basado en SNPs (*single nucleotide polymorphism*) (Brezina et al., 2011). Esta técnica es muy resolutive y ofrece información para todos los cromosomas. La condición necesaria es que el laboratorio de FIV debe contar de un programa optimizado de cultivo prolongado y alcanzar una tasa elevada de formación de blastocistos. En muchos casos es necesario combinarlo con técnicas de vitrificación ya que el tiempo necesario para el estudio genético es incompatible con la transferencia en fresco. Además, desde el punto de vista técnico, se requiere un sistema láser para la realización de la biopsia.

En base a lo expuesto, nuestro objetivo es presentar la validación de una nueva estrategia diagnóstica combinada para el diagnóstico genético molecular y citogenético de forma simultánea, en una sola célula embrionaria biopsiada en día 3. Nuestra estrategia combina técnicas de amplificación genómica completa, PCR, minisecueñación, análisis de fragmentos y CGHa, de forma que podemos obtener el genotipado del embrión y el estado de ploidía para los 24 cromosomas, compatible con la transferencia en fresco.

### MATERIAL Y MÉTODOS

La validación de la técnica se diseñó con linfocitos procedentes de cuatro estudios de informatividad realizados según los criterios de calidad de nuestro laboratorio (Vendrell et al., 2009): distrofia miotónica de Steinert (expansión de la región 3'UTR del gen *DMPK*), enfermedad de Charcot-Marie-Tooth 1A (duplicación que incluye al gen *PMP22*), hemofilia A (estudio indirecto mediante haplotipos) y síndrome de Marfan (mutación c.1285C>T en el gen

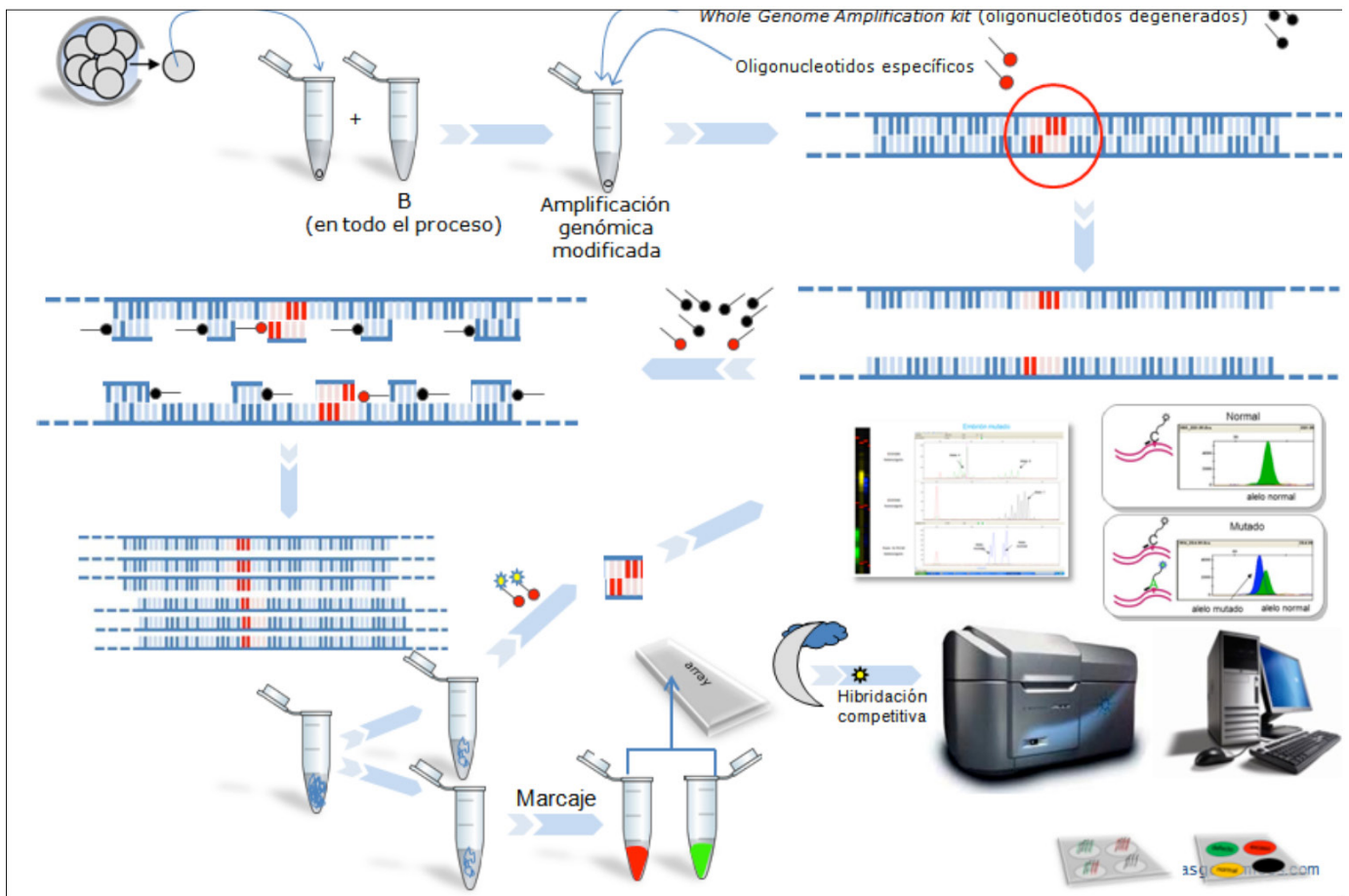


Figura 1. Esquema general del proceso de DGP combinado.

*FBN1*). Los linfocitos para la validación fueron aislados en 2 µl de PBS pH 7.2 sin Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup> (Invitrogen) suplementado con 0.1% de PVA (polyvinyl alcohol 87-90% hydrolyzed; Sigma Aldrich Quimica) tal y como fue descrito previamente (Alberola et al., 2009). Se utilizaron 5 linfocitos de los estudios de distrofia miotónica de Steinert y enfermedad de Charcot-Marie-Tooth 1A y 10 linfocitos

de los estudios de hemofilia A y síndrome de Marfan. Las células aisladas fueron sometidas a amplificación total del genoma mediante el kit SurePlex Amplification System (BlueGnome®) con ligeras modificaciones en la fase de preamplificación, utilizando los oligonucleótidos directos externos y reversos listados en la Tabla 1. Una vez amplificado el genoma, una alícuota se

destinó para PCR y otra alícuota para la realización del array CGH (Figura 1). En primer lugar se procedió a la amplificación específica de las regiones donde se localizan las mutaciones y de los marcadores microsatélite colindantes mediante PCR heminested fluorescente, utilizando los oligonucleótidos directos marcados con fluorescencia y los reversos no marcados (Tabla 1) y que

Tabla 1. Secuencias 5'→3' de los oligonucleótidos utilizados en la validación del DGP combinado. Los marcadores microsatélite están ordenados de centrómero a telómero respecto del gen estudiado.

Enfermedad	*Mutación/ STR	Het.	d (Mb)	Exon	R	Fin	Seq
Distrofia miotónica de Steinert	D19S374	0.83	1.15	CAGGAGACTCGCTTGAAC	TTTATGGACCGCTGAGGT	6FAM-TGGAGGTTGTAGTGACCCGA	-
	APOC2	0.80	0.82	GGTAAGAAAGGACTCAGGGTGC	CATAGCGAGACTCCATCTCC	VIC-GGGAGAGGGCAAAGATCGAT	-
	D19S219	0.77	0.28	GGAGAATFGCTTGAACCCAG	GAATGACTATTTCTGAGACAG	6FAM-CAGTGAAGCCAAAGATTGTGCC	-
	DMPK	n/a	n/a	CGGGCAACGGGGCTCGAAGG	CAGCTGGCCGAAGAAGAAATGG	6FAM-AAGGTCCTTGTAGCCGGAAATGCTG	-
Hemofilia A	D19S406	0.81	1.70	GCCAGAGGAGGAACAGGG	GCCAACACACTCTTCGCTTC	NED-AGGGCTGGACCTCACCTG	-
	DXS9897	0.72	1.60	GCTGTACTGTCAAGTGC	GAAAGAGATGAAGTAGCAGC	6FAM-GGTAGTCTATTGTGCTGTG	-
	DXS8087	0.75	1.17	CTGGAGTCCTGAGGCAG	GCACACTCGGAACAGC	VIC-CAGACATGCACAGGCAGAC	-
	DXS1073	0.62	0.23	CAGCGTGAATGGGTC	CAAAGAATGCCCTCCGAG	PET-GGTTGGCTTGGGTGGAAAT	-
Síndrome de Marfan	FS122	?	1.22	GACCCCTAGCTTTCATAAGC	TTGTCCAGAACCCAGACAT	NED-CACTGGCAGAGGACACACTC	-
	DXS1108	0.78	0.61	GTAGAGGAAGAAATGAAAGC	TGTAGCACTAGGGCACTAAT	6FAM-GAGATAGGAATGTGGAGTG	-
	Amelogenina	n/a	n/a	ACCTATCTGGGCACCCCTGG	ATCAGAGCTTAAACCTGGGAAGCTG	NED-CCCTGGGCTCTGTAAGAATAGT	-
	D15S1059	0.84	0.94	GCTGAATTACCAATGAGATGGCAGTAG	CAAGGATAAAGTATTTGTTCCTCTATC	PET-CTGGGAAGAGAGCGAGGCA	-
Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth	D15S123	0.81	0.64	GAGCTTGATTCTATCTCTTTC	CAAATCTTGGCCCAAGCTGTAGC	6FAM-GCTGAACCAATGGACTCTGTG	-
	FBN1-E10	n/a	n/a	GCTGTGCTGTTCCTATGG	CTCCCGAGATGGATACAGAT	6FAM-GAGACCAGAATATCTCCCT	GACCTCAAATCCGGTCCCT
	D15S94	?	0.34	GATTGAGCCAGGAGGTC	GTGGCTTAGAAACTGACTG	6FAM-GTTGCTGCAATCCAGCCTAA	-
	D15S103	0.77	0.41	GCAAGTGAATGAAATGCCCTC	CCCTTCTGAGTCTCTAT	6FAM-GGCTCATCATGTAGCAGAAATG	-
Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth	D17S976	0.89	2.97	GACTGACGGGTGGATTAC	GTGGTAGCATGCATCTGTAG	6FAM-ATATGCCACCACACCTGGTT	-
	D17S122	0.70	0.76	CCTTGTCTTGGCTGATTC	CAGACAGACCAGGCTCTGC	6FAM-CAGAACCACAAAATCTTTCG	-
	9B	0.79	0.54	TGCTGGCAAGTGTCTATC	CCAGACTAACCCACATTTCA	6FAM-TCTCAGTCTGTATTCTTGATTTG	-
	D17S1358	0.74	0.70	CCAAAGTGTGGGATTACAG	GTGGGCTACTCTAATACATC	6FAM-CCTAATTACACAATCTTTTGGG	-
D17S799	0.68	1.96	CTACTCTGACAGAGGCTTTTGTGAC	CGACCAGCATATCATTATAGACAAGC	PET-GACCCATGCATACCTCACCTCAAAGC	-	

Het = Heterocigosidad; d (Mb) = distancia al gen en megabases; Exon = Oligonucleótido externo directo; Fin = Oligonucleótido interno directo; R = Oligonucleótido reverso; Seq = Oligonucleótido utilizado para la minisequenciación; STR = marcadores microsatélite; N/A = no aplica.

\*Número de identificación procedente de Geneloc: Exon-based integration of human genome maps. *Bioinformatics* 19(S1). URL: <http://geneloc.weizmann.ac.il/geneloc>

**Tabla 2.** Resultados de la validación del DGP combinado.

Enfermedad	ADO	AP	FA	aCGH <sup>a</sup>
Distrofia miotónica de Steinert	3/12 (25%)	0/12 (0%)	8/20 (40%)	5/5 (100%)
Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth 1A	1/20 (5%)	5/20 (25%)	7/25 (28%)	5/5 (100%)
Hemofilia A	2/50 (4%)	8/50 (16%)	1/50 (2%)	10/10 (100%)
Síndrome de Marfan	3/50 (6%)	0/50 (0%)	3/50 (6%)	10/10 (100%)

ADO = Allele drop-out; AP = Amplificación preferencial; FA = fallo de amplificación; aCGH = array CGH.

<sup>a</sup>Porcentaje de concordancia con la dotación cromosómica esperada tras la hibridación con el array.

resultaron informativos para cada caso en su correspondiente estudio de informatividad previo, siguiendo los criterios publicados anteriormente (Bautista-Llàcer et al., 2010). Para cada mutación o marcador microsatélite se realizó una PCR en un volumen total de 10 µL conteniendo: 200 µM dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1X PCR buffer, 1 unidad de *Go-Taq Hot Start* polymerase (Promega) y 0.4 µM de oligonucleótido directo y reverso, utilizando un termociclador TProfessional standard Thermocycler (Biometra, Germany). Se programaron 30 ciclos de amplificación a 95°C durante 1 minuto, 55°C durante 45 segundos, y 72°C por 1 min. Inicialmente se realizó un paso de desnaturalización previo a 95°C durante 5 minutos y se finalizó con un paso adicional de extensión a 72°C durante 7 minutos. Los amplicones obtenidos fueron secuenciados en un secuenciador automático ABI3730xl (AppliedBiosystems, USA). Los resultados fueron analizados con el software Genemapper v3.7 (AppliedBiosystems, USA). En el caso del síndrome de Marfan, el amplicón donde se encuentra la mutación se minisequenció con el kit SNaPshot multiplex kit (AppliedBiosystems, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos obtenidos fueron secuenciados en un secuenciador automático ABI3730xl (AppliedBiosystems, USA) y los resultados analizados con el software Genemapper v3.7 (AppliedBiosystems, USA). Para el array CGH, se realizó una electroforesis en agarosa al 0.8% con el marcador LowMass™Ladder (Invitrogen™) de los productos obtenidos tras la amplificación total del genoma, para determinar si efectivamente había amplificación. Los linfocitos que amplificaron y un

ADN de referencia se marcaron con los fluoróforos Cy3 y Cy5 respectivamente, mediante el kit de marcaje Fluorescent Labelling System [dCTP] (Bluegnome) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN marcado se hibridó con los arrays 24Sure V2 (Bluegnome) y se escaneó con la plataforma G2565CA de Agilent Technologies. Los resultados se analizaron con el software BlueFuseMulti (Bluegnome).

## RESULTADOS

Los datos de fallo de amplificación de la PCR, ADO (*allele drop-out*, el fallo de amplificación de PCR aleatorio de uno de los dos alelos en una muestra heterocigota), amplificación preferencial y resultado del array CGH de cada estudio se detallan en la Tabla 2. En la Figura 2 se muestra un ejemplo de electroferograma y del gráfico del array CGH de un linfocito del estudio del síndrome de Marfan.

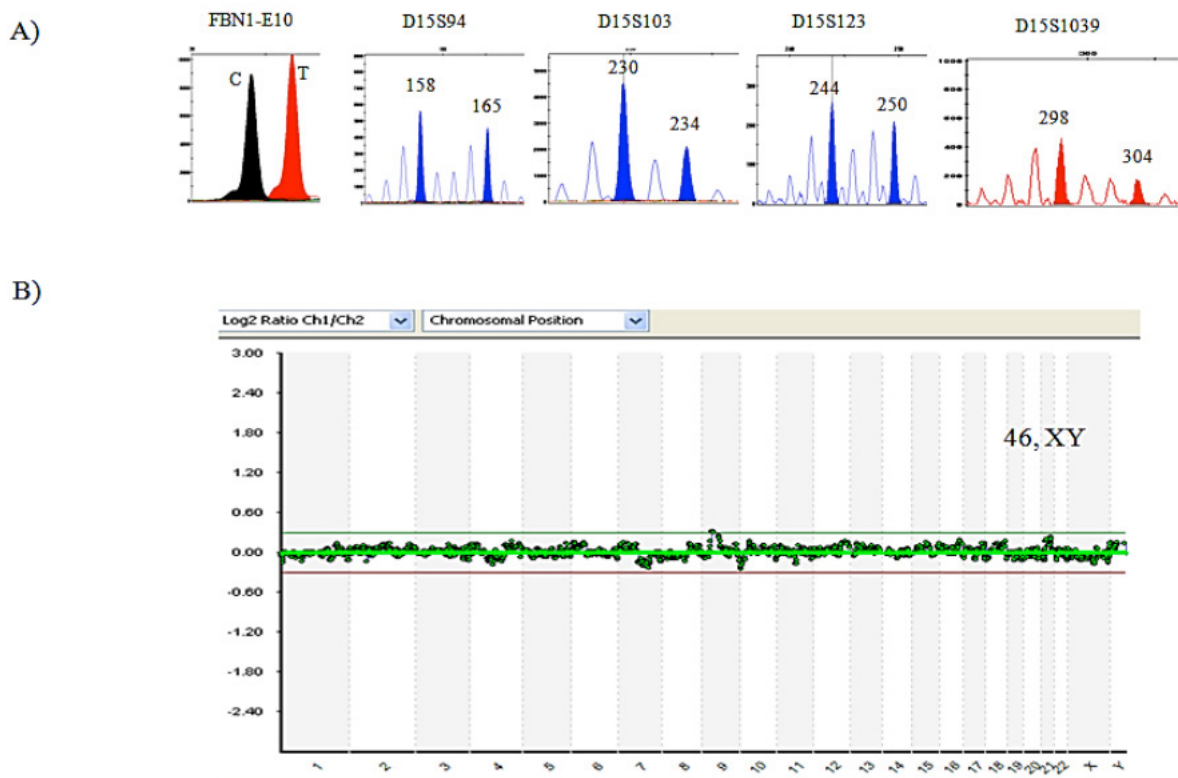
## DISCUSIÓN

La combinación de técnicas de amplificación genómica completa con técnicas de secuenciación de ADN y CGHa, permite el genotipado de una célula única y el análisis de su ploidía. Esta nueva aproximación diagnóstica puede aplicarse para cualquier enfermedad monogénica en la que esté determinada la mutación causal y se quiera obtener además el estudio de aneuploidías para los 23 pares de autosomas y los cromosomas sexuales. Esta estrategia va dirigida a la aplicación en embriones de parejas portadoras, o con un miembro afecto, de enfermedades monogénicas y que además presenten una indicación de estudio de la aneuploidía embrionaria.

Por otro lado, representa una enorme ventaja en los casos en que coexistan dos, o más, anomalías genéticas. En concreto, en aquellos casos en los que coincide una enfermedad monogénica y una trastorno cromosómico (reordenamientos cromosómicos equilibrados). El tiempo dedicado al estudio genético es compatible con la transferencia en fresco o diferida, indistintamente, y no es necesario rebiopsiar el embrión en diferentes estadios o biopsiar más de una célula.

La consolidación del DGP como una técnica de rutina ha hecho posible el desarrollo de nuevas aproximaciones diagnósticas para dar respuesta a escenarios clínicos complejos (Alberola et al., 2009). Una de las principales limitaciones del DGP de indicación genética estricta, es la falta de información relativa a la ploidía de los embriones. No obstante, es bien conocido que los embriones humanos en estadio preimplantación presentan elevadas tasas de aneuploidía (Fragouli et al., 2013) y mosaicismo (Van Echten-Arends et al., 2011). Estas alteraciones numéricas se ven incrementadas en determinados grupos de pacientes. Fundamentalmente, en aquellos casos en los que existe un factor etiológico que desencadena la no disyunción durante la meiosis gamética. La edad materna avanzada o la espermatogénesis alterada en varones, son dos de los factores más correlacionados con la aneuploidía embrionaria y los malos resultados reproductivos, incluso tras la aplicación de técnicas de reproducción asistida. En muchos casos, estos factores coexisten con el riesgo de transmitir enfermedades monogénicas a la descendencia.





**Figura 2.** A) Ejemplo de electroferograma de un linfocito amplificado con Sureplex del estudio de síndrome de Marfan. FBN1-E10 corresponde al amplicón minisequenciado donde se sitúa la mutación puntual *c.1285C>T* (C: citosina; T: timina). D15S94, D15S103, D15S123 Y D15S1039 son los marcadores microsatélites utilizados en el estudio. Los números corresponden al tamaño de fragmento de los alelos. B) Gráfico de la dotación cromosómica del mismo linfocito tras el array CGH.

La cantidad de ADN inicial es la principal limitación de esta técnica. Por esta razón, la aplicación pasa necesariamente por una fase previa de amplificación del genoma completo (WGA: *whole genome amplification*). Se han descrito diversas técnicas de amplificación del genoma (Coskun y Alsmadi, 2007). Básicamente consiste en una amplificación inespecífica de la secuencia genómica completa que rinde cantidades del orden de microgramos respetando la secuencia original. Existen métodos, basados en PCR y no basados en PCR, que han sido ampliamente revisados por Zheng y colaboradores (Zheng et al., 2011). De esta forma la WGA ha permitido combinar diferentes indicaciones en el mismo ciclo de DGP. Así ha sido descrito, por ejemplo, en casos de selección de embriones histocompatibles o *arrays* citogenéticos, en combinación con el genotipado de enfermedades monogénicas (Handyside et al., 2004; Brezina et al., 2011). La optimización de esta fase resulta crítica para garantizar al máximo la

preamplificación de la región de interés en cada caso. Las características de la secuencia de ADN en la región de interés resultan relevantes. Existen zonas que pueden ser refractarias a los procesos de preamplificación o pueden estar infrarrepresentadas. En estos casos el diagnóstico molecular podría verse comprometido. Para asegurar al máximo que las zonas génicas implicadas en la enfermedad concreta sean amplificadas en cada caso, se incorporaron oligonucleótidos específicos de la mutación y de los microsatélites que se pretendían estudiar, en la reacción de preamplificación genómica (Figura 1). De esta forma, se suma la acción de los oligonucleótidos aleatorios (inespecíficos) propios del WGA y los oligonucleótidos específicos que actúan como una PCR *heminested* I. Las condiciones de la reacción se optimizan para que coexistan los dos grupos de *primers*.

Por otro lado, nuestro esquema de DGP se basa fundamentalmente en el genotipado directo del embrión.

Por este motivo, nos enfrentamos a diferentes tipos de mutaciones que se abordan por metodologías muy distintas (revisado en: Vendrell y Bautista-Llácer, 2012). Esta es la razón por la cual la validación se ha centrado en regiones diferentes del genoma (genes distintos), mutaciones distintas y metodologías distintas. En todos los casos la validación se ha llevado a cabo en condiciones de célula única (linfocitos). El protocolo se estableció para un caso de una mutación dinámica, en concreto la expansión del triplete CTG del gen *DMPK*, responsable de la distrofia miotónica de Steinert; una duplicación que incluye el gen *PMP22* completo, responsable de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth 1A; la mutación puntual *c.1899G>T* en el gen *F8* responsable de la hemofilia A y la mutación puntual *c.1285C>T* en el gen *FBN1* causante del síndrome de Marfan. En todos los casos se estimaron tres parámetros como indicadores de la precisión global del proceso. El rendimiento se estimó calculando el porcentaje de amplificación y la



**Tabla 3.** Resultados reproductivos de los casos de DGP molecular combinado con CGHa en célula única.

Enfermedad	Gen	Mutación	Nº Embriones analizados	Nº embriones diagnosticados		Nº Embriones transferibles	Embarazo
				Molecular	Citogenética		
Cáncer colorectal hereditario no polipósico	<i>MLH1</i>	c.1783_1784delAG	7	4	7	0	No
Cáncer de mama y ovario	<i>BRCA1</i>	c.211A>G	8	6	6	0	No
Charcot-Marie-Tooth tipo 1B	<i>MPZ</i>	c.132C>T	9	5	5	0	No
Displasia arritmogénica del ventrículo derecho	<i>DSP</i>	c.3115dupG	6	6	4	2	No*
Gangliosidosis tipo 1	<i>GLB1</i>	c.176G>A	7	6	2	2	No
Neurofibromatosis tipo 1	<i>NF1</i>	c.4309G>T	E.i	-	-	-	-
Neurofibromatosis tipo 1 + Síndrome de Turner (mosaico)	<i>NF1</i>	c.5546G>A	E.i	-	-	-	-
Síndrome de Alport ligado al X + 46 XY t(9;22)(q34;q11.2)	<i>COL4A5</i>	c.2722G>A	E.i	-	-	-	-

\*Beta-hCG positiva, no se evidencia saco con latido fetal.

E.i: estudio de informatividad finalizado. Caso en fase preclínica.

AP (amplificación preferencial), el porcentaje de ADO (*allele dropout*) y el porcentaje de hibridación del CGHa. Concretamente la tasa de ADO resulta crucial para poder estimar la eficacia. El ADO es la no amplificación aleatoria de uno de los alelos de una muestra heterocigota y puede ser la causa de errores de diagnóstico adversos (Wilton et al., 2009) ya que se podría interpretar como normal un embrión afecto de una enfermedad monogénica dominante. Además, en los casos de enfermedades recesivas, el ADO del alelo afecto podría alterar el número de embriones portadores disponibles para la transferencia, comprometiendo el éxito del ciclo de DGP. En la presente validación se ha tenido en cuenta el incremento de la temperatura de desnaturalización y la lisis alcalina, como métodos dirigidos a reducir al máximo las tasas de ADO, tal como ha sido descrito previamente (Piyamongkol et al., 2003, Thornhill et al., 2005).

Los datos obtenidos de la validación permiten abordar el diagnóstico combinado en determinadas parejas. En todos los casos el estudio de informatividad es crucial. La validación en célula única de las condiciones específicas para cada pareja y cada tipo de mutación resulta enormemente relevante (Alberola et al., 2011; Bautista-Llácer et al., 2010; Vendrell et al., 2011). Desde el punto de vista clínico tras la validación, hemos aplicado este esquema combinado, con algunas modificaciones, en ocho casos (Tabla 3). Por el momento no se ha conseguido ningún embarazo clínico. En nuestra experiencia, desde el punto de vista de los resultados reproductivos, la principal limitación que presenta esta técnica es el número de embriones para el análisis. El hecho de sumar indicaciones reduce el número de embriones disponibles para la transferencia. La combinación con técnicas de vitrificación y acumulación de ovocitos/embriones puede ser una estrategia válida para estos casos de doble o triple indicación. Por otro

lado, la tendencia general de cultivo a blastocisto y biopsia de trofoblasto podría reducir la limitación relativa a la cantidad inicial de ADN en la célula única. Los datos de correspondencia entre constitución cromosómica del trofoblasto y la masa celular interna (Capalbo et al., 2013), hacen pensar en el DGP combinado en trofoblasto como una estrategia prometedora.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberola T.M., Bautista-Llácer R., Fernández E., Vendrell X., Pérez-Alonso M. Preimplantation genetic diagnosis of P450 oxidoreductase deficiency and Huntington Disease using three different molecular approaches simultaneously. *J Assist Reprod Genet.* 2009; 26: 263-271.

Bautista-Llácer R., Alberola T.M., Vendrell X., Fernández E., Pérez-Alonso M. Case report: first successful application of preimplantation genetic diagnosis for hereditary angioedema. *Reprod Biomed Online.* 2010;21: 658-662.

- Brezina PR, Benner A, Rechitsky S, Kuliev A, Pomerantseva E, Pauling D, Kearns WG. Single-gene testing combined with single nucleotide polymorphism microarray preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy: a novel approach in optimizing pregnancy outcome. *Fertil Steril*. 2011;95(5):1786.e5-8.
- Capalbo A, Wright G, Elliott T, Ubaldi FM, Rienzi L, Nagy ZP. FISH reanalysis of inner cell mass and trophectoderm samples of previously array-CGH screened blastocysts shows high accuracy of diagnosis and no major diagnostic impact of mosaicism at the blastocyst stage. *Hum Reprod*. 2013;5. [Epub ahead of print]
- Coskun S, Alsmadi O. Whole genome amplification from a single cell: a new era for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn*. 2007;27(4):297-302.
- De Vos A., Staessen C., De Rycke M., Verpoest W., Haentjens P., Devroey P., Liebaers I., and Van de Velde H. Impact of cleavage-stage embryo biopsy in view of PGD on human blastocyst implantation: a prospective cohort of single embryo transfers *Hum Reprod*. 2009;24(12):2988-2996.
- Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Jaroudi S, Sarasa J, Enciso M, Wells D. The origin and impact of embryonic aneuploidy. *Hum Genet*. 2013 Apr 26. [Epub ahead of print].
- Goossens V, De Rycke M, De Vos A, Staessen C, Michiels A, Verpoest W, Van Steirteghem A, Bertrand C, Liebaers I, Devroey P et al. Diagnostic efficiency, embryonic development and clinical outcome after the biopsy of one or two blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod*. 2008;23:481-492.
- Gutiérrez-Mateo C, Colls P, Sánchez-García J, Escudero T, Prates R, Ketterson K, Wells D, Munné S. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertil Steril*. 2011;95(3):953-8.
- Handyside A.H., Robinson M.D., Simpson R.J., Omar M.B., Shaw M.A., Grudzinskas J.G., Rutherford A. Isothermal whole genome amplification from single and small number cells: a new era for preimplantation genetic diagnosis of inherited disease. *Mol Hum Reprod*. 2004;10:767-772.
- Harton G.L., Magli M.C., Lundin K., Montag M., Lemmen J., and Harper J.C. ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group—best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS). *Hum Reprod*. 2011;26(1):41-46.
- Lee HS, Jun JH, Choi HW, Lim CK, Yoo HW, Koong MK, Kang IS. Preimplantation genetic diagnosis for ornithine transcarbamylase deficiency by simultaneous analysis of duplex-nested PCR and fluorescence in situ hybridization: a case report. *J Korean Med Sci*. 2007;22(3):572-6.
- Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Toschi M, Esposito F, Fasolino MC. The combination of polar body and embryo biopsy does not affect embryo viability. *Hum Reprod*. 2004;19(5):1163-1169.
- Piyamongkol W, Vutyavanich T, Piyamongkol S, Wells D, Kunaviktikul C, Tongsong T, Chaovitsaree S, Saetung R, Sanguanserm Sri T. A successful strategy for Preimplantation Genetic Diagnosis of beta-thalassemia and simultaneous detection of Down's syndrome using multiplex fluorescent PCR. *J Med Assoc Thai*. 2006;89(7):918-27.
- Piyamongkol W., Bermudez M., Harper J., Wells D. Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: implications for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod*. 2003;9:411-420.
- Thornhill A.R., deDie-Smulders C.E., Geraedts J.P. ESHRE PGD Consortium Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS). *Hum Reprod*. 2005;20: 35-48.
- Van Echten-Arends J, Mastenbroek S, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Heineman MJ, van der Veen F, Repping S. Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: a systematic review. *Hum Reprod Update*. 2011;17(5):620-7.
- Vendrell X, Bautista-Llácer R. A methodological overview on molecular preimplantation genetic diagnosis and screening: a genomic future?. *Syst Biol Reprod Med*. 2012;58(6):289-300.
- Vendrell X., Bautista-Llácer R., Alberola T.M., García-Mengual E., Pardo M., Urries A., Sánchez J. Pregnancy after PGD for recessive dystrophic epidermolysis bullosa inversa: genetics and preimplantation genetics. *J Assist Reprod Genet*. 2011;28:825-832.
- Vendrell X, Carrero R, Alberola T, Bautista-Llácer R, García-Mengual E, Claramunt R, Pérez-Alonso M. Quality management system in PGD/PGS: now is the time. *J Assist Reprod Genet*. 2009;26(4):197-204.
- Verlinsky Y, Rechitsky S, Laziuk K, Librach C, Genovese R, Kuliev A. Preimplantation genetic diagnosis for Pelizaeus-Merzbacher disease with testing for age-related aneuploidies. *Reprod Biomed Online*. 2006;12(1):83-8.
- Wilton L., Thornhill A., Traeger-Synodinos J., Sermon K.D., Harper J.C. The causes of misdiagnosis and adverse outcomes in PGD. *Hum Reprod*. 2009;24: 1221-1228.
- Zheng Y.M., Wang N., Li L., Jin F. Whole genome amplification in preimplantation genetic diagnosis. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2011;12:1-11.

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

“En general, recomendamos que el embrión deberá cambiarse a medio nuevo global Total cada 48 horas. Sin embargo, es posible mantener el embrión en la misma gota o largos volúmenes de medio, durante 4 días o más, dependiendo de la calidad del aire y las condiciones medioambientales en el laboratorio y en el Incubador”

(ver Reed et al., 209;2010)

Reference: Reed ML, Hamic A, Thompson DJ, Caperton CL (2009) Continuous uninterrupted single médium culture without médium renewal versus sequencial media cultura: a sibling embryo study. Fertil Steril 92,1783-6

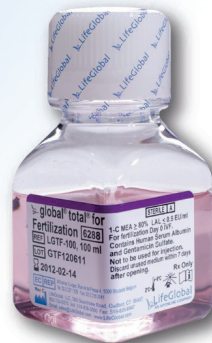
**Medio único con más de 30 publicaciones certificadas, en sus más de 10 años en el mercado.**



**LifeGuard™**  
Aceite mineral de alta viscosidad



**Global Total™**  
Fertilización



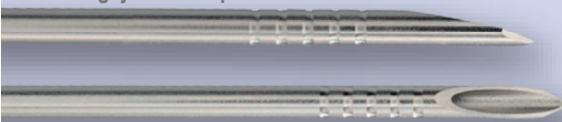
**Global Total™**  
Hepes



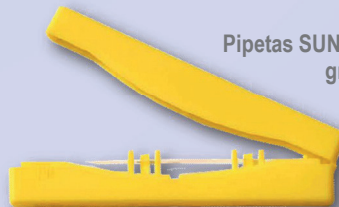
**Sistema S3 para la Vitrificación de Blastocistos Humanos:**

- No contiene DMSO
- Glicerol y Etileno Glicol, como Crioprotectores. Global w/ Hepes, como medio base
- Sistema de sellado cerrado, con pajuelas convencionales

CCD - Aguja OPS de punción de ovocitos



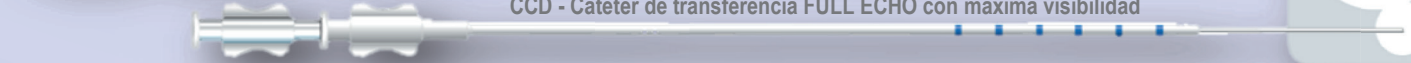
Pipetas SUNLIGHT USA para ICSI en todas las graduaciones y modelos



CCD - Catéter de transferencia PEARL TIP con esfera distal



CCD - Catéter de transferencia FULL ECHO con máxima visibilidad



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



MATERIAL CONSUMIBLE

Y TODO EL EQUIPAMIENTO NECESARIO PARA EL LABORATORIO FIV





# COMUNICACIONES ORALES

## O-001: ESTUDIO DE INFORMATIVIDAD EN ESPERMATOZOIDES ÚNICOS: LA MEJOR ESTRATEGIA PARA DGP DE MUTACIONES DE NOVO EN EL VARÓN

R. Bautista-Llácer; E. García-Mengual; T. Alberola; M. Pardo; E. Raga; C. Sánchez-Matamoros; X. Vendrell.  
Sistemas Genómicos, Laboratorio de DGP molecular, Parque Tecnológico de Valencia, Ronda G. Marconi 6, 46980 Paterna (Valencia).  
[rosa.bautista@sistemasgenomicos.com](mailto:rosa.bautista@sistemasgenomicos.com)

### INTRODUCCIÓN

El diagnóstico genético preimplantación (DGP) es una opción reproductiva bien establecida, y representa una alternativa válida al diagnóstico genético prenatal en los casos de enfermedades monogénicas. En este contexto, más de 200 enfermedades afectando a miles de parejas, han sido estudiadas mediante esta aproximación. En todos los casos el estudio de informatividad previo a la fecundación *in vitro* resulta necesario, para poder establecer en qué copia del gen se sitúa la mutación, o mutaciones, causante de la enfermedad. Según las recomendaciones del *PGD Consortium* de la ESHRE, la mutación objeto de estudio debería estar genotipada en el embrión y se debería poder asociar cada mutación a marcadores (microsatélite) que se utilizan como apoyo en el diagnóstico. Esta asociación de la mutación con su haplotipo la conocemos como "asociación alélica". Para establecerla, se estudian al menos dos meiosis en familiares afectados, y no afectados, por la enfermedad. Esto no siempre es posible y un claro ejemplo son las mutaciones *de novo* (no heredadas). En estos casos el estudio de informatividad resulta muy limitado y no permite establecer la asociación antes del DGP. En el caso de varones con mutaciones *de novo* es posible obtener la información alélica de los propios espermatozoides. La mitad de los espermatozoides serán portadores del alelo mutado y la otra mitad del sano. Esta información resulta enormemente necesaria para poder resolver estos casos de la forma más segura.

### OBJETIVOS

Presentar el estudio de informatividad en espermatozoides únicos procedentes de varones con mutaciones *de novo*

en casos de DGP de enfermedades monogénicas, y determinar las ventajas e inconvenientes de esta estrategia diagnóstica.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 5 parejas donde el varón presentaba una mutación *de novo* para las enfermedades monogénicas: paraparesia espástica familiar (mutación c.1639A>G; gen *SPAST*), distrofia miotónica de Steinert (premutación; *DMPK*), poliquistosis renal autosómica dominante tipo 1 (c.4888C>T; *PKD1*), osteogénesis imperfecta tipo 1 (c.3495C>G; *COL1A1*) y síndrome de Marfan (c.1869C>A; *FBN1*). Se procesaron 5 muestras de eyaculado fresco. Las muestras fueron lavadas y capacitadas mediante gradientes de densidades. La fase móvil se alicuotó y los espermatozoides fueron aislados uno a uno en tubos de PCR. Los espermatozoides aislados se sometieron a una lisis alcalina. La mutación y los marcadores microsatélites implicados en el estudio de informatividad fueron amplificados mediante PCR multiplex heminested fluorescente. Al mismo tiempo, se incluyó un control positivo del eyaculado. Los amplicones fueron secuenciados automáticamente mediante electroforesis capilar y el análisis de los fragmentos obtenidos se realizó mediante el software Genemapper. Asimismo, las mutaciones puntuales fueron minisequenciadas.

### RESULTADOS

Se aislaron un total de 300 espermatozoides únicos y 120 espermatozoides fueron amplificados. En cada pareja se procesaron entre 20-40 espermatozoides. En todos los casos se consiguió establecer el haplotipo asociado a la mutación. Hasta el

momento actual 2 parejas han podido realizar el ciclo de DGP y las otras 3 están pendientes de programar sus ciclos.

### CONCLUSIÓN

El análisis de espermatozoides únicos permite establecer los haplotipos, asociado y no asociado, a la mutación objeto de estudio, siempre que la mutación sea susceptible de amplificación mediante la técnica de PCR. Esto permite aumentar las garantías diagnósticas al realizar el DGP en parejas donde el varón presenta una mutación *de novo* o cuando no hay familiares disponibles para el estudio de informatividad.

## 0-002: MELATONINA Y CALIDAD ESPERMÁTICA. ESTUDIO IN VITRO

F. Monllor<sup>1</sup>; I. Bejarano<sup>2</sup>; G. Lozano<sup>1</sup>; A. Ortiz<sup>1</sup>; MI. Jiménez<sup>1</sup>; A. Marchena<sup>2</sup>; J. Espino<sup>2</sup>; F. Malpartida<sup>1</sup>; P. Gaspar<sup>1</sup>; JA. Pariente<sup>2</sup>; A. Rodríguez<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Centro Extremeño de Reproducción Humana Asistida (CERHA). <sup>2</sup>Departamento de Fisiología. Universidad de Extremadura  
[fabianmonllor@hotmail.com](mailto:fabianmonllor@hotmail.com)

### INTRODUCCIÓN

Está ampliamente reconocido que desajustes en la regulación de la apoptosis están involucrados en numerosas patologías que afectan a la fertilidad masculina. El estrés oxidativo causado por un aumento de la generación de especies reactivas de oxígeno fomenta la aparición de procesos apoptóticos. La excelente capacidad antioxidante de la melatonina la hace una posible candidata para ser usada en la mejora de la calidad espermática frente al estrés oxidativo y consecuente apoptosis.

### OBJETIVO

Estudiar si el tratamiento *in vitro* de las muestras seminales con melatonina mejora la calidad de las mismas.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de semen se obtuvieron de 20 pacientes (20-40 años) normozoospermicos, sometidos a técnicas de reproducción asistida (TRA) en el Centro Extremeño de Reproducción Humana Asistida (CERHA), tras abstinencia de 2-3 días. El eyaculado se dividió en dos fracciones. Una se incubó con melatonina 1mM y la otra no. Transcurridos 30 minutos se dividieron ambas en dos partes y se les realizó swim-up en presencia y ausencia de melatonina. De cada una de las fracciones se fijaron 0,5 ml con paraformaldehído (PFA) al 2%. Se analizó la concentración según manual OMS 2010 y la movilidad mediante sistema ASAC. En las muestras fijadas se determinaron, por citometría de flujo, los siguientes indicadores:

- Actividad Caspasa-3 mediante el anticuerpo fluorescente específico de la forma activa de la enzima.
- Cuantificación de espermatozoides capacitados a través de la medición de la proteína CD46 mediante anticuerpo fluorescente específico.

- Compactación de ADN. Los espermatozoides fueron incubados con yoduro de propidio para valorar la uniformidad de la compactación del ADN espermático así como su fragmentación.

El análisis de varianza de comparaciones múltiples se llevó a cabo mediante el test estadístico post hoc de Tukey, tomando como valores significativos  $p < 0.05$ .

### RESULTADOS

Se obtuvo una disminución de la actividad caspasa-3 y de la fragmentación del ADN debido a la incubación con melatonina. El descenso más acusado se obtuvo en el eyaculado, si bien, durante el swim-up la melatonina también ejerció este efecto aunque en menor proporción.

Por otra parte se duplicó la proporción de reacción acrosómica cuando se incubó el fresco con melatonina durante 30 minutos.

En cuanto a la compactación del ADN no se obtuvo apenas diferencias ni en % de células compactadas ni en la uniformidad de la compactación del ADN.

Tampoco se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a concentración y parámetros de movilidad.

### CONCLUSIONES

A la vista del efecto que produce la incubación con melatonina sobre procesos tan importantes para la fisiología espermática como la actividad de caspasa-3, la fragmentación del ADN y la reacción acrosómica, esta hormona podría convertirse en una herramienta eficaz en la selección de espermatozoides que van a utilizarse en TRA.

Este trabajo está financiado por Angelini Farmacéutica. Agradecemos

al Servicio de Técnicas Aplicadas a la Biociencia (STAB) de la Universidad de Extremadura su apoyo técnico. J. Espino es beneficiario de un contrato predoctoral del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (AP2009-0753).

## O-003: EN BUSCA DE MARCADORES DE RESISTENCIA AL CRIODAÑO ESPERMÁTICO

E. Sellés; S. García-Herrero; J A. Martínez; M. Muñoz; M. Meseguer; N. Garrido.  
IVI Alicante, Alicante. IVI Valencia, Valencia  
[elena.selles@ivi.es](mailto:elena.selles@ivi.es)

### INTRODUCCIÓN

El semen congelado ha sido empleado durante décadas para la preservación de la fertilidad masculina para su uso en reproducción asistida por diferentes

motivos. La calidad seminal después de descongelar es muy variable, incluso en consecutivas muestras del mismo individuo. Las bases moleculares de una adecuada resistencia a la criopreservación son aún desconocidas, y su conocimiento nos permitiría mejorar la selección para congelar o la adición de suplementos al medio empleado. El análisis con microarrays es una buena herramienta que nos permite obtener una explicación molecular de este acontecimiento, comparándonos la expresión del mRNA bajo dos condiciones biológicas diferentes: óptima y subóptima supervivencia.

### OBJETIVOS

Caracterizar los patrones de expresión genómica de muestras de semen dependiendo de la resistencia a la criopreservación para determinar que genes están implicados en la sensibilidad al criodañó.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se evaluaron muestras de semen de donantes que fueron previamente congelados con los protocolos convencionales de congelación, categorizados como: *Más Resistentes* (n=20) (menos de 20% de descenso en móviles progresivos) o *Menos Resistentes* (n=20) (más de 35% de descenso en móviles progresivos) según supervivencia post-descongelación. El mRNA espermático fué extraído usando el protocolo de Trizol Sperm mRNA, suspendido en DEPC tratado con agua y congelado a -80°C hasta que el experimento de microarray fuera

desempeñado. RNAs fue analizado en Agilent Bioanalyzer 2100. Los resultados fueron evaluados para detectar si estos genes se expresaban de manera diferente en ambos grupos. Los criterios usados en las diferentes series de muestras fueron: existencia común a ambos grupos (GC) (cambio de expresión de 2.0 veces o más) y genes exclusivos (GE) expresados en un grupo pero no en el otro (nivel de intensidad más grande que la media de densidad del control plus negativo 2 veces desviación estándar en uno de los dos grupos).

### RESULTADOS

Solamente fue detectado un gen común (GC) que se expresaba diferencialmente, DUSP4 con un aumento de expresión en el grupo de los *Menos Resistentes*.

28 secuencias fueron encontradas exclusivamente en los *Más Resistentes* (synaptotagmin XIV, calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit-8, cyclic nucleotide gated channel alpha-4, brix domain containing-1, solute carrier family 5 member-12, deiodinase-iodothyronine type I, synaptosomal protein29kDa, ATPase, H+/K+ transporting, nongastric, alpha polypeptide, PR domain containing-15, transcript variant 1, solute carrier family-8, member 3 neuroglobin, proteolipid protein 2, protein phosphatase 1-subunit12A, GABA<sub>A</sub>, IL-33, zinc finger protein 230, disrupter silencing 10, NLR family, CARD domain containing-5, poly(A)-specific ribonuclease-like domain containing 1, remodeling spacing factor 1, potassium channel tetramerisation domain containing-12).

30 genes fueron encontrados exclusivamente en el grupo de los *Menos Resistentes* (zinc finger protein 36, C3H type-like 2, YTH domain family,

member 1, ataxin 2-binding protein 1, transcript variant 3, aminoacylase 1-like 2, E-1 enzyme, olfactory receptor, family 5, subfamily AP, member 2, RAB43, member RAS oncogene family, transmembrane protein 81, G patch domain and KOW motifs, LAG1 homolog, ceramide synthase 4, zinc finger protein 588, APEX nuclease 1, transcript variant 3, PPAR binding protein, PR domain containing 5, dynein, axonemal, heavy chain like 1, cyclin B3, transcript variant 3, ankyrin domain 49, complement 5a receptor 1, protocadherin beta 12).

### CONCLUSIONES

De estos resultados, determinamos que estos genes implicados en la diferencia de supervivencia a la criopreservación, permiten continuar una investigación más directa con el fin de desarrollar una herramienta molecular para predecir la criosupervivencia, y comprender mejor la fisiología de la congelación espermática para poder complementar el medio de criopreservación que salve esa deficiencia espermática que los hace menos resistentes al proceso.



## O-004: DIFERENCIAS EN EL METILOMA DE ESPERMATOZOIDES ENTRE INDIVIDUOS FÉRTILES E INFÉRTILES

C. Camprubí<sup>1</sup>, G. Castellano<sup>2</sup>, M. Grossmann<sup>3</sup>, N. Garrido<sup>4</sup>, MC. Pons<sup>3</sup>, I. Martín-Subero<sup>2</sup>, J. Blanco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona.

<sup>2</sup>Unidad de Hematopatología, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona.

<sup>3</sup>Unidad de Reproducción Asistida de Centro Médico Teknon, Barcelona. <sup>4</sup>Laboratorio de Andrología y Banco de Semen, Instituto Universitario IVI Valencia, Valencia

[cristina.camprubi@uab.cat](mailto:cristina.camprubi@uab.cat)

### INTRODUCCIÓN

En humanos conocemos alteraciones genéticas que afectan negativamente la eficiencia de la espermatogénesis. No obstante, la base epigenética de la infertilidad es bastante desconocida. El perfil epigenético de los espermatozoides es crucial para el buen funcionamiento de la célula germinal masculina. La metilación del DNA durante la espermatogénesis juega un papel relevante en la progresión de la meiosis, el silenciamiento de retrotransposones, y el desarrollo posterior del embrión.

En consecuencia, la influencia del epigenoma de gametos sobre la capacidad reproductiva de las parejas se ha postulado como una de las causas potenciales que explicarían un número significativo de casos de infertilidad. En este sentido se han identificado perfiles alterados de metilación en espermatozoides de pacientes infértiles de genes regulados por impronta genómica, de genes implicados en la espermatogénesis o de genes que participan en la ruta del folato.

Actualmente, el desarrollo de estrategias de análisis a gran escala es aplicable al estudio del epigenoma espermático cuyo conocimiento permitirá identificar las variaciones que afectan la fertilidad.

### OBJETIVOS

Identificar perfiles de metilación alterados en muestras de DNA procedente de espermatozoides de individuos infértiles mediante el análisis del metiloma utilizando la plataforma de análisis masivo Infinium HumanMethylation450 BeadChip (HM-450 BeadChip) (Illumina Inc.).

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron muestras de semen procedentes de 63 individuos, 19 controles y 44 pacientes infértiles. Todas las muestras fueron procesadas y analizadas de forma independiente. La extracción del DNA espermático se realizó con el kit PUREGEN (Gentra Systems). El DNA fue tratado con bisulfito sódico utilizando el EZ DNA Methylation-Direct Kit (Zymo Research). El análisis del estado de metilación del genoma se realizó mediante la plataforma de análisis masivo HM-450 BeadChip que permite analizar más de 485.000 dinucleótidos CpG por muestra.

Con el fin de identificar las CpG deferencialmente metiladas entre las muestras control y problema se compararon los niveles de metilación por CpG mediante el test de Wilcoxon. El listado de CpGs diferencialmente metiladas se analizó mediante la plataforma *DAVID Bioinformatics Resources* (versión 6.7) con el fin de identificar procesos biológicos enriquecidos.

Finalmente se clasificaron como loci con perfiles alterados de metilación aquellos que presentaban un mínimo de 3 CpG alteradas que afectaban como mínimo el 50% del total de CpGs de la región.

### RESULTADOS

Identificamos 697 de las 485.317 CpGs analizadas con diferencias de metilación entre individuos control e infértiles. El análisis de ontología génica no identificó ningún proceso biológico enriquecido. Un total de 22 loci fueron seleccionados por presentar perfiles

alterados de metilación. El análisis de la función asociada a estos genes reveló que cinco estaban directamente relacionados con la espermatogénesis (*PRDM1*, *MSH5*, *PATE4*, *JAM3* y *NCOR2*) y tres codificaban para factores de transcripción de expresión ubicua en el organismo (*FOXX1*, *FOXX2*, *ZNF33A*). Los transcritos de *FOXX1*, *FOXX2* y *JAM3* incluyen PIWI-interacting RNAs (piRNAs) en su secuencia.

### CONCLUSIONES

Hemos identificado anomalías de metilación potencialmente relacionadas con la infertilidad masculina. El análisis de expresión de los genes con perfiles alterados de metilación y de los piRNAs asociados, nos permitirá confirmar la implicación de las anomalías detectadas como la causa subyacente de la infertilidad.

### AGRADECIMIENTOS

Proyectos: PS09/00330 (Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación); SGR2009-282 (Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca, Generalitat de Catalunya).

## O-005: ETIQUETAJE DIRECTO DE MUESTRA SEMINAL HUMANA CON MICROCÓDIGOS DE POLISILICIO

S. Novo<sup>1</sup>, I. Mora-Espí<sup>1</sup>, L. Barrios<sup>1</sup>, E. Ibáñez<sup>1</sup>, R. Gómez-Martínez<sup>2</sup>, J. Esteve<sup>2</sup>, J.A. Plaza<sup>2</sup>, C. Nogués<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

<sup>2</sup> Instituto de Microelectrónica de Barcelona IMB-CNM (CSIC), Bellaterra, Spain.

[sergi.novo@gmail.com](mailto:sergi.novo@gmail.com)

### INTRODUCCIÓN

Los mix-ups de muestras reproductivas han estado asociados, hasta el momento, a errores de identificación de muestras de semen y embriones durante su procesamiento en el laboratorio de reproducción asistida. Nuestro grupo ha desarrollado un sistema de etiquetaje directo para ovocitos y embriones que otorga una mayor seguridad en la trazabilidad de estas muestras. No obstante, la mayoría de los mix-ups documentados están relacionados con errores de identificación de la muestra seminal. Debido a que, normalmente, una muestra seminal está formada por millones de espermatozoides, utilizar la metodología de etiquetaje directo desarrollada para embriones y ovocitos no es factible. Sin embargo, la utilización de microcódigos de polisilicio disueltos en la muestra seminal en el momento de su recogida permitiría mantener la muestra etiquetada en todo momento.

### OBJETIVO

Los objetivos de este trabajo fueron demostrar que la presencia de los microcódigos de polisilicio no afecta a la viabilidad de los espermatozoides, tanto durante su procesamiento como después de la criopreservación, y que el sistema desarrollado permite la identificación de la muestra en cualquier momento de su procesamiento.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras seminales fueron donadas específicamente para este proyecto (3 donantes). Una vez en el laboratorio, se cuantificó el número de espermatozoides de cada muestra y se dividieron las muestras en dos partes iguales, una fue etiquetada y la otra no (control). El etiquetaje se realizó depositando 120.000 microcódigos de

polisilicio (10x6x1 µm) en un recipiente de obtención de muestras fluidas. Al introducir la muestra en este recipiente, los microcódigos se resuspendieron en el fluido seminal. La mitad de la muestra etiquetada y de la muestra control fue criopreservada directamente (Sperm CryoProtect II Nidacon), mientras que otra mitad fue procesada mediante gradientes de densidad (SpermGrad, Vitrolife) para seleccionar la fase móvil antes de su criopreservación. Los espermatozoides de la fase móvil fueron cuantificados y se valoró su viabilidad (kit LIVE/DEAD Sperm Viability, Molecular Probes) tanto en la muestra control como en la etiquetada. En esta última también se cuantificó el número de microcódigos presentes. Todas las muestras fueron descongeladas 7 días después y se cuantificó el número de espermatozoides y su viabilidad y, en la porción etiquetada, el número de microcódigos presentes.

### RESULTADOS

La concentración media de espermatozoides por mililitro (esp/ml) en las 4 muestras fue de  $2,5 \times 10^8 \pm 0,8 \times 10^8$ . Después de la extracción de la fase móvil, no hubo diferencias en el número de esp/ml recuperados ni en su viabilidad entre la porción etiquetada ( $2,4 \times 10^7 \pm 0,3 \times 10^7$  esp/ml; 62,1±1,2%) y la control ( $2,6 \times 10^7 \pm 0,4 \times 10^7$  esp/ml; 64,1±1,8%). Después de descongelar la muestra procesada el número de esp/ml y su viabilidad también fueron equivalentes entre la porción etiquetada ( $1,6 \times 10^7 \pm 0,5 \times 10^7$  esp/ml; 65,4±4,8%) y la control ( $1,7 \times 10^7 \pm 0,4 \times 10^7$  esp/ml; 63,0±5,5%). Después de descongelar la muestra no procesada y extraer la fase móvil, el número de esp/ml y su viabilidad fueron equivalentes entre la porción etiquetada ( $5,2 \times 10^6 \pm 0,6 \times 10^6$  esp/ml; 50,3±13,3%) y la control ( $4,9 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^6$  esp/ml; 50,7±12,0%).

En todos los casos y procedimientos realizados la concentración de microcódigos utilizada asegura la identificación de la muestra, siempre que el volumen utilizado de muestra de espermatozoides sea como mínimo de 1 µL.

### CONCLUSIONES

El sistema de etiquetaje de muestra seminal por introducción de microcódigos de polisilicio en el fluido que contiene los espermatozoides no afecta a la viabilidad de estos durante su procesamiento ni después de la criopreservación. Además, los microcódigos no interfieren en la recuperación de la fase móvil mediante gradientes de densidad. Finalmente, durante todo el proceso un número elevado de microcódigos permanecen vinculados a la muestra de espermatozoides lo que permite la identificación de la muestra en todo momento y por tanto su correcta trazabilidad.

## O-006: RESULTADOS CLÍNICOS DE PGS EN PACIENTES CON FISH ALTERADO EN ESPERMATOZOIDES: COMPARACIÓN ENTRE FISH 9 SONDAS VS CGH ARRAY

P. Muñoz-Soriano, E. Ferrer-Robles, M. Ferrer-Buitrago, C. Calatayud-Lliso, M. Ruiz-Jorro  
CREA. Centro médico de Reproducción Asistida. València.  
[patricia.munoz@creavalencia.com](mailto:patricia.munoz@creavalencia.com)

### INTRODUCCIÓN

El screening genético de aneuploidías (PGS) es una técnica de prevención primaria que permite seleccionar embriones euploides. Actualmente, son varias las indicaciones para su realización: parejas con antecedentes de abortos de repetición, fallos repetidos de implantación o alteraciones del cariotipo, mujeres de edad avanzada y varones con FISH alterado.

Se ha descrito relación entre FISH alterado y oligo o teratozoospermias severas, abortos de repetición o fallos repetidos de implantación. Aproximadamente un 25% de los casos en que se solicita un estudio de FISH en espermatozoides, presentan un resultado alterado, el cual se relaciona con incremento en la tasa de aneuploidías de embriones biopsiados para PGS (Sánchez-Castro, 2009). Como consecuencia, se observará una disminución en la tasa de implantación, y aumento en la de aborto.

El PGS se realiza principalmente mediante dos técnicas: estudio de 9 cromosomas por FISH o estudio de 24 cromosomas por CGHa. Éste último ofrece, además de una fase de preparación de blastómeras más sencilla, una capacidad de diagnóstico más amplia, que podría influir, positivamente, en el resultado del ciclo.

### OBJETIVO

Análisis de resultados clínicos de PGS por FISH en espermatozoides alterado, comparando dos técnicas de diagnóstico preimplantacional: FISH 9 cromosomas y CGHa

### MATERIAL Y MÉTODOS

Para el análisis retrospectivo de datos se utilizaron pruebas t-test y  $\chi^2$ . Sólo se

analizaron los datos de ciclos en los que hubo biopsia. Todos los tratamientos se llevaron a cabo en el mismo periodo de tiempo. Se incluyeron ciclos en los que la edad de la paciente fue menor de 37 años o bien, ciclos de donación de ovocitos, para evitar la influencia de la edad materna en el resultado de PGS. Se biopsiaron embriones que presentaban al menos 5 blastómeras en D+3 de desarrollo.

### RESULTADOS

Se analizaron los resultados obtenidos de 94 ciclos de PGS analizados mediante FISH 9 sondas (n= 43) y CGHa (n= 51). Se biopsiaron un total de 307 y 298 embriones, respectivamente.

La homogeneidad de los grupos se confirmó considerando los siguientes parámetros: Edad media ovocitos (32.2; 5.1 vs 30.9; 5.6 p=0.23), número de ovocitos recuperados (12.9; 5.4 vs 11.6; 5.3 p=0.24), número de ovocitos maduros (11.1; 4.6 vs 10.1 p=0.27), tasa de fecundación (76% vs 73% p=0.50), número de embriones en D+3 (7.4 vs 6.5 p=0.09) y número de embriones biopsiados (7.1 vs 5.8 p=0.03) y número de embriones transferidos ( 1.6 vs 1.3 p=0.06)

El porcentaje de embriones sanos respecto a los biopsiados fue 35.9 vs 35.0 p=0.85, la tasa de cancelación 13.9 vs 13.7 p=0.98, la tasa de implantación 29.2 vs 37.2 p=0.51, la tasa de embarazo por ciclo 37.2 vs 39.2 p=0.98, la tasa embarazo por transferencia 43.2 vs 45.5 p=0.84, y la tasa de aborto \* 18.8 vs 15.4 p=0.81.

\*En el análisis de la tasa de aborto no se consideraron ciclos realizados en 2013, para asegurar embarazo en marcha > 20 semanas de gestación. [FISH 9 sondas (n= 16) y CGHa (n= 13)]

### CONCLUSIONES

El CGHa proporciona una capacidad de diagnóstico más amplia que el FISH de 9 cromosomas, y como consecuencia, se esperarían unos resultados clínicos mejores. No obstante, según nuestros datos, los resultados de los ciclos PGS en casos FISH alterado no varían en función de la técnica de análisis utilizada.

La aplicación de un FISH de 9 sondas o de CGHa dependerá de las características de cada laboratorio, ya que cada técnica requiere de unas instalaciones, una preparación y un material diferente.

Es necesaria la realización de futuros estudios, con tamaños muestrales mayores, para contrastar estos resultados.

## O-007: EVOLUCIÓN Y ANÁLISIS CROMOSÓMICO DE EMBRIONES MULTINUCLEADOS

M. Parriego<sup>1</sup>, S. Nadal<sup>1</sup>, M. Boada<sup>1</sup>, D. Tuñón<sup>1</sup>, S. Mateo<sup>1</sup>, B. Coroleu<sup>1</sup>, A. Veiga<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Servicio de Medicina de La Reproducción. Hospital Universitario Quirón Dexeus. 08028 Barcelona.

<sup>2</sup> Banc de Línies Cel·lulars. Centre de Medicina Regenerativa. 08006 Barcelona.

[monpar@dexeus.com](mailto:monpar@dexeus.com)

### INTRODUCCIÓN

La multinucleación embrionaria (MN) se define como la presencia de dos o más núcleos en uno o más blastómeros de un embrión y tradicionalmente se ha considerado como un criterio indicativo de baja calidad embrionaria y mal pronóstico de implantación.

Estudios realizados sobre el contenido cromosómico de los embriones multinucleados muestran que mayoritariamente son anormales por lo que suelen descartarse para la transferencia como primera opción. Aun así, se ha visto que la constitución genética de este tipo de embriones no es siempre anormal y varias publicaciones describen recién nacidos sanos a partir de transferencias homogéneas de embriones multinucleados.

La técnica de Hibridación Genómica Comparada (CGH) aplicada al Diagnóstico Genético Preimplantacional (PGD) permite conocer todo el complemento cromosómico de los embriones analizados, permitiendo la selección de embriones euploides para la transferencia.

### OBJETIVO

El objetivo del presente estudio es conocer el contenido cromosómico de los embriones multinucleados procedentes de ciclos de DGP-CGH así como su evolución posterior.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron retrospectivamente los datos correspondientes a 112 ciclos DGP-CGH para cribado de aneuploidías realizados durante los años 2011 y 2012.

Las indicaciones para el DGP fueron: factor masculino de origen genético

(n=51), abortos de repetición (n=23), fallos de implantación (n=20), edad materna avanzada (n=14), concepción previa afecta de cromosomopatía (n=3) y presencia de una alteración numérica en el cariotipo (n=1)

La observación de la presencia/ ausencia de MN se valoró en los timings habituales de observación de la morfología embrionaria (46±2 horas en D+2, 68±2 horas en D+3). La biopsia de los embriones se realizó en D+3. Únicamente se biopsiaron aquellos embriones de ≥6 células y ≤35% fragmentación. La amplificación del DNA, el marcaje y la hibridación sobre arrays de CGH se realizó siguiendo el protocolo establecido por el fabricante (BlueGnome©). Para el análisis de las imágenes escaneadas se utilizó el algoritmo de CytoChip y el Software BlueFuse (BlueGnome©). Los embriones evolutivos euploides se transfirieron en D+5 o se vitrificaron en estadio de blastocisto para su uso posterior.

### RESULTADOS

Se incluyeron 1023 embriones de 112 ciclos. En 50 ciclos (44.6%) se observó al menos un embrión MN en D+2 o D+3. El total de embriones multinucleados fue de 105 lo que representa una tasa de multinucleación de 10.3% (105/1023). La multinucleación se observó mayoritariamente en D+2 (88.6%) frente al 12.4 % de los casos donde se detectó en D+3. Ochenta y un embriones multinucleados fueron aptos para la biopsia (77.1%).

Se obtuvo diagnóstico de 73 (90.1%) de los embriones multinucleados analizados. Un 82.2% (60/73) resultaron cromosómicamente anormales. El 55% (33/60) de los embriones anormales presentaron

aneuploidía compleja (tres o más cromosomas implicados) mientras que el resto 45% (27/60) se clasificaron como aneuploidía simple (uno o dos cromosomas implicados).

Trece de los embriones MN fueron diagnosticados como normales (17.8%) y once presentaron una correcta evolución morfológica hasta D+5 (84.6%): 9 transferidos y 2 vitrificados. Se realizaron 8 transferencias con embriones multinucleados que dieron lugar a 7 gestaciones. Cinco de los sacos implantados fueron atribuibles a la implantación de embriones multinucleados y dieron lugar al nacimiento de 5 niños sanos.

### CONCLUSIÓN

En este estudio, los embriones multinucleados diagnosticados como normales mediante DGP-CGH, presentaron un buen desarrollo embrionario y una elevada capacidad de implantación. Los 5 niños nacidos sanos confirman que los embriones multinucleados dan lugar a gestaciones evolutivas y por lo tanto, puede considerarse su transferencia en caso de no disponer de embriones sin multinucleación.



## O-008: LA CONTRACCIÓN DE LOS BLASTOCISTOS AFECTA NEGATIVAMENTE AL ÉXITO REPRODUCTIVO REDUCIENDO SU TASA DE IMPLANTACIÓN; UN ESTUDIO TIME-LAPSE

S. Pérez, J. Marcos, M. Moya, T. Vilorio, JL Romero, M.J. De los Santos, M. Meseguer  
IVI Valencia, Valencia  
[sonia.perez@ivi.es](mailto:sonia.perez@ivi.es)

### INTRODUCCIÓN

La eclosión natural es un hecho necesario para la implantación de los blastocistos humanos en el endometrio. Mediante la tecnología time-lapse, podemos observar con detalle que eventos tienen lugar durante el desarrollo embrionario, concretamente antes de la eclosión. Entre ellos destaca la contracción o colapso de los blastocistos que se puede producir previamente al fenómeno de eclosión durante la fase de expansión del mismo.

Hemos definido la contracción como un fenómeno en el cual el trofotodermo se separa de la zona pelúcida en más del 50% de su superficie. De acuerdo con la literatura científica, basada en observaciones puntuales de los embriones, esta clase de contracción de los blastocistos afecta negativamente a su proceso de eclosión natural.

### OBJETIVO

Identificar la contracción o colapso de los blastocistos como un marcador de calidad embrionaria y potencial reproductivo.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo de cohortes entre 2009-2012 en las clínicas IVI de Valencia y Murcia, sobre un total de 460 pacientes sometidos a tratamiento de ICSI. La monitorización embrionaria se realizó con imágenes tomadas cada 15 minutos en 5 planos focales en un incubador con una cámara incorporada (EmbryoScope™, UnisenseFertiliTech, Aarhus Denmark). De los 715 blastocistos transferidos seleccionamos 502 para un análisis detallado basado en la implantación: 100% implantación (n=94) (el número

de sacos gestacionales coincidió con el número de embriones transferidos); o 0% de implantación (n=408) (no hubo embarazo bioquímico). El tiempo se expresó en horas tras ICSI e identificamos los blastocistos que presentaron contracción así como los tiempos de división. Los embriones se analizaron y se seleccionaron para transferencia según los criterios de morfología convencional y morfocinética. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante ANOVA y Chi-cuadrado dependiendo de las variables contempladas.

### RESULTADOS

Un total de 139 (19.4% (CI95% 16.5-22.3)) embriones presentaron al menos un colapso o contracción. Todos los embriones estudiados eran morfológicamente comparables en D+2, D+3 y D+5 de desarrollo embrionario, no existiendo en ningún caso relación entre el colapso del blastocisto y la evaluación morfológica estándar. Tampoco se observaron diferencias en la incidencia de la eclosión de los blastocistos entre los grupos con (C) o sin colapso (SC) (grupo C: 31,4% vs grupo SC: 28,7%).

Las pacientes que presentaron al menos un blastocisto colapsado (C) no presentaron ninguna diferencia en sus características clínicas como edad, IMC, protocolos de estimulación, dosis de gonadotropinas, años de esterilidad, número de ciclos previos o etiología femenina o masculina respecto a los pacientes con transferencia con blastocistos SC.

En cuanto a los resultados clínicos, los blastocistos con colapso vieron reducida significativamente su tasa de implantación respecto a los que no

colapsaron; C) 35.1% (CI95% 25,3-44,9), SC) 48.5% (CI95% 43,6-53,4).

Los parámetros morfocinéticos demostraron que los embriones sin colapso eran significativamente más lentos que los colapsados (t2: 26,9 vs 25,4; t3: 37,7 vs 36,4; t4: 39,3 vs 37,9; tM: 86,3 vs 80,9; tB: 101,9 vs 98,0) (p<0.001).

### CONCLUSIONES

Estos resultados describen y demuestran por primera vez en humanos la relación entre la contracción de los blastocistos y el éxito reproductivo gracias a la tecnología de time-lapse. En embriones cultivados *in vitro*, las contracciones juegan un papel muy importante en la implantación, afectando negativamente a la calidad del embrión y reduciendo su posibilidad de implantación. Los mecanismos moleculares relacionados con este proceso son aún desconocidos aunque podrían asociarse a un estrés mecánico y un excesivo consumo energético del embrión que afectarían negativamente a su desarrollo posterior. En base a los resultados aquí presentados sería recomendable evitar la transferencia de embriones que presenten un colapso previo a la eclosión para mejorar la selección y en consecuencia aumentar las tasas de implantación por transferencia.

## O-009: REVITRIFICACIÓN: EMBRIONES CRIOPRESERVADOS PROCEDENTES DE OVOCITOS VITRIFICADOS

J. Muñoz, A. Silván, M. Toledano, M. Brandt, J. A. García Fernández, E. Garijo, F. Galera.  
Instituto Madrileño de Fertilidad (IMF), Madrid  
[jmunoz@imfertilidad.com](mailto:jmunoz@imfertilidad.com)

### INTRODUCCIÓN

La eficacia de la vitrificación de óvulos ha ido mejorando con el tiempo, alcanzando tasas de supervivencia y embarazo similares a las de ovocitos frescos. Como consecuencia de esta mejora, han ido aumentando el número de embriones de buena calidad y por tanto se va incrementando el número de embriones revitrificados. Lógicamente se generaron dudas sobre la seguridad y viabilidad de esta doble vitrificación, ya que se ignoraban las consecuencias que pudiera tener sobre los embriones.

### OBJETIVOS

Evaluar la supervivencia y la tasa de gestación de embriones procedentes de ovocitos vitrificados y compararlas con las de embriones desvitrificados procedentes de ovocitos frescos.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Hace 4 años se implementó en nuestro centro la técnica de vitrificación del Cryotop (Kitazato, Japan) desarrollada por el Prof. Kuwayama. Desde entonces hemos realizado más de 400 vitrificaciones de ovocitos.

Se realizaron 190 desvitrificaciones de las que 79 revitrificaron (un total de 262 embriones).

Se descongelaron 126 embriones procedentes de 54 ciclos de desvitrificación.

Paralelamente se desvitrificaron 1334 embriones de 626 pacientes de ovocitos en fresco.

Las transferencias se realizaron entre 2 y 5 horas después de la desvitrificación, en placas de Global Total (LifeGlobal) con cánulas de transferencia TDT (CCD).

La prueba de embarazo se realizó 12 días después de la transferencia, y en caso de embarazo, se hizo ecografía 10 días más tarde.

### RESULTADOS

	Propios		Ovodon		Total	
	Vitri	Revitri	Vitri	Revitri	Vitri	Revitri
<b>Supervivencia embrionaria</b>	701/750 (93.5%)	18/19 (94.7%)	633/650 (97.4%)	101/105 (96.2%)	1334/1400 (95.3%)	119/126 (94.4%)
<b>Beta Positiva</b>	135/300 (45%)	5/11 (45.4%)	125/261 (47.9%)	22/43 (51.2%)	260/561 (46.3%)	27/54 (50%)
<b>Gestación Clínica/ Evolutiva</b>	128/300 (42.6%)	5/11 (45.4%)	120/261 (45.9%)	19/43 (44.2%)	240/561 (42.8%)	24/54 (44.4%)

Análisis estadístico realizado mediante G-Stat. Si  $p < 0.05$  se consideran diferencias significativas.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos.

### CONCLUSIONES

Las tasas de supervivencia embrionaria y de gestación son comparables entre los embriones vitrificados una sola vez y los embriones revitrificados.

Podemos concluir que la vitrificación doble o revitrificación es un método seguro y eficaz.

# O-010: EFECTO DE LA VITRIFICACIÓN OVOCITARIA EN LA MORFOCINÉTICA EMBRIONARIA

J. Herreros, J. Teruel, M. Esbert, N. Costa, A. Ballesteros, M. Florensa  
 IVI Barcelona (Barcelona)  
[javier.herreros@ivi.es](mailto:javier.herreros@ivi.es)

## INTRODUCCIÓN

La vitrificación se basa en el uso combinado de elevadas concentraciones de crioprotector con el mínimo volumen de medio y tasas de enfriamiento ultrarrápido, evitando así la formación de hielo y con ello el daño celular. En los últimos años esta técnica de criopreservación ovocitaria es la que ofrece mejores resultados en cuanto a eficiencia. A pesar de esto son necesarios más estudios que comparen la utilización de ovocitos en fresco y ovocitos vitrificados para confirmar la validez de la técnica.

Por otro lado, los tiempos de división junto a la morfología embrionaria se consideran indicadores del potencial de desarrollo de un embrión, por lo que la observación embrionaria mediante cinematografía permitiría optimizar la clasificación morfológica y una mejora de la selección de embriones a transferir.

## OBJETIVOS

Estudiar, utilizando tecnología *time-lapse*, las diferencias en la morfocinética embrionaria entre embriones provenientes de ovocitos en fresco o vitrificados en el programa de donación de ovocitos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio de cohortes retrospectivo que incluye 70 ciclos de donación en fresco y 29 ciclos de donaciones con ovocitos vitrificados (periodo entre Agosto y Diciembre de 2012).

La monitorización embrionaria se realizó con imágenes tomadas cada 15 minutos en 5 planos focales diferentes durante al menos 68 horas en un

incubador con una cámara incorporada (EmbryoScope™, UnisenseFerilitech).

Los dos grupos de ovocitos, se inseminaron mediante la técnica de ICSI entre las 4 horas y media y las 6 horas tras la punción folicular, siendo el grupo de ovocitos criopreservados desvitrificados 2 horas antes de la microinyección.

El método empleado para la vitrificación/desvitrificación de ovocitos se basa en el descrito por Kuwayama.

El tiempo tras ICSI está expresado como tiempo de división a 2 células (t2), 3 (t3), 4 (t4), 5 (t5), 8 (t8). En los casos donde la transferencia se realizó el quinto día tras desarrollo también se calculó el tiempo necesario para llegar al estadio de mórula (tM) y blastocisto (tB).

Los resultados se analizaron mediante el test de *t-student*. Se consideró estadísticamente significativo un *P* valor < 0.05.

## RESULTADOS

Evaluada la media de horas de los diferentes parámetros de tiempo establecidos en nuestro estudio vemos que no se observan diferencias estadísticamente significativas entre las receptoras de ovocitos en fresco y vitrificados con respecto a la morfocinética embrionaria (tabla 1)

## CONCLUSIONES

Haciendo referencia a los resultados obtenidos en el presente estudio podemos otorgar a los ovocitos vitrificados la misma cinética de desarrollo que a los ovocitos en fresco. En este sentido, la donación de ovocitos vitrificados debe ser considerada como una alternativa real a la donación en fresco en los programas de donación de ovocitos.

Tiempos de División	Origen	N	Media	Desviación típ.	P valor
t2	Frescos	559	26,60	5,23	0,594
	Desvitrificado	240	27,26	5,60	
t3	Frescos	417	36,88	7,27	0,219
	Desvitrificado	189	36,75	6,19	
t4	Frescos	524	39,48	7,10	0,622
	Desvitrificado	240	39,78	6,65	
t5	Frescos	456	49,00	8,80	0,719
	Desvitrificado	212	49,73	8,47	
t8	Frescos	439	56,93	9,18	0,077
	Desvitrificado	174	56,89	8,15	
tM	Frescos	250	82,54	13,08	0,223
	Desvitrificado	109	81,86	13,73	
tB	Frescos	168	104,79	9,78	0,057
	Desvitrificado	78	102,77	7,34	

Tabla 1: Tiempos de división y origen ovocitario.

## O-011: SELECCIÓN EMBRIONARIA MORFOCINÉTICA MEDIANTE PRIMO VISION EN UN PROGRAMA DE TRANSFERENCIA ELECTIVA DE EMBRIÓN ÚNICO

A. Clavero; MC. Gonzalvo; ML. López; S. Carrillo; M. Rodríguez; L. Martínez; JA. Castilla.  
Hospital Universitario Virgen de la Nieves, Granada  
[marisalopezregalado@gmail.com](mailto:marisalopezregalado@gmail.com)

### INTRODUCCIÓN

Uno de los parámetros directamente relacionados con el éxito en los tratamientos de Reproducción Asistida es la calidad embrionaria, la cual se puede evaluar mediante sistemas de morfocinética. Estos estudios se basan en la monitorización mediante fotogramas de los embriones generados in vitro, lo cual nos da un análisis preciso y específico del desarrollo embrionario, todo ello sin exponer a los embriones a agresiones externas que puedan comprometer su viabilidad. Por tanto, estos sistemas permiten seleccionar el mejor embrión y puede usarse como una herramienta más en la implantación de la transferencia de embrión único (eSET).

### OBJETIVOS

Comprobar la eficacia de un sistema de morfocinética en un programa de eSET.

### MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se ha realizado de manera prospectiva utilizando un control histórico. En el grupo de estudio se incluyeron 22 parejas de buen pronóstico (mujeres menores de 38 años, primer ciclo de FIV/ICSI, sin intervenciones quirúrgicas, IMC 18,5 – 29 kg/m<sup>2</sup>, sin abortos de repetición) y los embriones resultantes se cultivaron en un sistema Primo Vision eligiéndose el de mejor calidad para eSET. El grupo control constó de 57 parejas seleccionadas de buen pronóstico en las que se realizó eSET. Todas las parejas se seleccionaron del programa FIV/ICSI del HUVN de Granada, siendo el grupo control seleccionado entre Enero 2010 y Diciembre 2012 y el grupo de estudio (prospectivo) de enero 2013 a Mayo 2013. Se analizaron las tasas de gestación clínica (observación de saco

embrionario con latido cardíaco a las siete semanas gestacionales) en ambos grupos, así como el tamaño muestral. Para evaluar la homogeneidad de los grupos se analizaron las variables correspondientes a las características clínicas de las parejas (edad de la mujer, tiempo de esterilidad, indicación clínica), a la respuesta a la estimulación (días de estimulación, dosis total de FSH, estradiol el día de hCG) y a resultados de laboratorio (número de ovocitos obtenidos, tasa de fecundación, número de embriones de calidad A/B, número de embriones criopreservados). Se utiliza el test  $\chi^2$  para variables cualitativas y el test de la t de Student para variables cuantitativas.

### RESULTADOS

No se observan diferencias significativas ni en las variables epidemiológicas ni en la respuesta a la estimulación entre los grupos. Tampoco se observan diferencias significativas en la media de ovocitos obtenidos entre el grupo de estudio y control ( $11,1 \pm 4,5$  vs  $11,5 \pm 3,8$  respectivamente), ni en el número de MII ( $9,0 \pm 3,9$  vs  $9,4 \pm 3,9$ ) ni en la media de embriones disponibles de buena calidad ( $2,4 \pm 1,9$  vs  $1,7 \pm 1,5$ ) ni de embriones criopreservados ( $2,3 \pm 1,9$  vs  $2,2 \pm 1,9$ ).

La tasa de gestación clínica en el grupo de estudio fue del 40,9% mientras que en el grupo control fue del 33,3%. Aunque existe una tendencia a mayor tasa de gestación clínica en el grupo de estudio no se alcanza la significación estadística. Con los resultados observados en el estudio, necesitaríamos 631 parejas en cada grupo para garantizar un error del 5% y una potencia del 80% si la diferencia entre grupos fuese igual o menor a la obtenida.

### CONCLUSIONES

Nuestros resultados indican una mejor tasa de gestación clínica por transferencia en las parejas en que se usó Primo Vision como sistema de selección embrionaria, aunque no se alcanza la significación estadística. Dado el elevado tamaño muestral requerido sería necesaria la realización de estudios multicéntricos encaminados a demostrar la eficacia de la morfocinética embrionaria en la eSET.



# O-012: VALORACIÓN DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE OXIGENO EN LA MORFOCINÉTICA EMBRIONARIA DURANTE EL CULTIVO A BLASTOCISTO

M. Martínez Burgos, C. Losada, C. López, D. Becerra, D. Agudo, F. Bronet.  
 IVI-Madrid, Aravaca, Madrid  
[monica.martinez@ivi.es](mailto:monica.martinez@ivi.es)

## INTRODUCCIÓN

El cultivo a blastocisto con bajas concentraciones de oxígeno parece mejorar los resultados clínicos en los tratamientos de reproducción. Además, la valoración de los tiempos de división celular durante el desarrollo embrionario esta suponiendo una novedosa herramienta para los embriólogos. Por lo tanto, conocer si la concentración de O<sub>2</sub> tiene algún efecto en la tasa de división celular de embriones humanos puede ser de gran ayuda para definir criterios de selección embrionaria más eficientes.

## OBJETIVOS

Evaluar si la concentración de oxígeno durante el cultivo embrionario a blastocisto, tiene algún efecto sobre los tiempos de división embrionaria.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Realizamos un estudio retrospectivo sobre 1830 cigotos cultivados hasta día 5 en incubadores con tecnología timelapse (EmbryoScope; Unisense Fertilitech), entre diciembre de 2011 y abril de 2013. Comparamos: (Incubador 1) 617 cigotos en Trigas (5% O<sub>2</sub>, 6% CO<sub>2</sub>, 89% N<sub>2</sub>) e (incubador 2) 1213 cigotos en 6% CO<sub>2</sub> en aire (aprox. 20% O<sub>2</sub>).

Medimos en cada cigoto el tiempo (en horas post ICSI) que tarda en alcanzar 2 pronúcleos (t2PN), desaparición de pronúcleos (tPF), división celular hasta mórula (t2, t3, t4...), mórula (tM), comienzo de blastulación (tB), blastocisto expandido (tBE) e inicio de eclosión (tHB). Se utilizó el test Mann-Whitney (Wilcoxon) para comparar los tiempos medios de división celular entre ambos grupos.

Valoramos también variables asociadas con altas tasas de implantación descritas previamente en Trigas, con rangos óptimos de tiempo en horas para cada una: t5 (rango óptimo 48.8-56.6 horas), duración del segundo ciclo celular (cc2=t3-t2; rango óptimo <12 horas) y sincronía de 2 a 4 células (s2=t4-t3; rango óptimo <0.75).

## RESULTADOS

Nuestros resultados muestran una velocidad en la tasa de división significativamente mayor, desde la formación de pronúcleos hasta la formación de mórulas, para los embriones cultivados en Trigas (incubador 1), siendo la diferencia entre las media más alta la correspondiente al tiempo de división a 8 células (3.21 horas). Tabla 1

En consecuencia, el porcentaje de embriones que caen en el rango óptimo descrito previamente de la variable cc2 y s2 es inferior para los embriones cultivados sin trigas, mientras que hay un mayor porcentaje de estos en t5. Tabla 2.

## CONCLUSIONES

En base a nuestros resultados, los embriones cultivados en bajas concentraciones de O<sub>2</sub> presentan una velocidad de división significativamente mayor hasta el estadio de mórula. Estamos realizando un análisis más detallado para intentar conocer la implicación que esto pueda tener en cuanto a los criterios de selección embrionaria en día 3 en función de la concentración de oxígeno durante el cultivo embrionario.

Tabla 1

	t 2PN	t PF	t2	t3	t4	t5	t6	t7	t8	t9+	tM	tB	tBE	tHB
TRIGAS	9,11	23,21	25,92	35,72	37,85	47,16	50,52	53,77	57,5	66,44	85,15	103,74	111,82	111,96
NO TRIGAS	9,67	24,45	27,69	37,45	39,98	49,91	53,44	56,9	60,71	69,38	87,38	104,27	112,7	111,37
p-valor W	p<0.05	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.05	ns	ns	ns

Tabla 2

	t5	cc2(t3-t2)	s2 (t4-t3)
TRIGAS	28,53	73,74	55,75
NO TRIGAS	33,31	55,98	46,99
p-valor	p<0.05	p<0.01	p<0.01

# O-013: EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PREDICTIVA DE IMPLANTACIÓN DE MARCADORES MORFO-CINÉTICOS TEMPRANOS

M. Pigni; F. Graña; L. M. R. Menes; P. Duque; V. Sánchez; J. Quintana; E. García; P. De la Fuente; C. García-Ochoa  
 CEFIVA, Oviedo  
[maitena@cefiva.com](mailto:maitena@cefiva.com)

## INTRODUCCIÓN

Actualmente tenemos la posibilidad de disponer de incubadores con la capacidad de aportar imágenes del desarrollo embrionario en el laboratorio de embriología clínica, lo que nos aporta gran cantidad de información acerca de la evolución embrionaria y ayuda a la hora de seleccionar los embriones a transferir.

A pesar de que ya existen modelos de clasificación embrionaria basados en el patrón temporal de desarrollo embrionario (1) es necesario seguir investigando acerca de este aspecto y tener presente que pueden existir variaciones asociadas a las condiciones de cada laboratorio por lo que es importante analizar cada uno sus propios datos que permitan crear modelos más ajustados a las condiciones específicas de cada centro.

## OBJETIVOS

Determinar el valor predictivo de implantación y los rangos óptimos de los tiempos de aparición (aPN) y desaparición de pronúcleos (dPN), momento en que se produce la primera división celular (t2) y tiempo que permanecen visibles los PN (tPN), bajo las condiciones de cultivo de nuestro laboratorio.

## MATERIAL Y MÉTODO

Para este estudio se han analizado los parámetros aPN, dPN, t2 y tPN de todos los embriones con certeza de implantación – no implantación, es decir, los casos en que han implantado todos los embriones transferidos o ninguno. Esto ha supuesto el análisis de 320 casos de los cuales 36 han sido de implantación y 284 no implantación. Se han analizado embriones de ciclos de entre enero de 2012 y marzo de 2013 tanto de ovodonación como de ovocitos propios.

Todos los casos presentes en este estudio han sido cultivados en el EmbryoScope. Como medio de cultivo se ha utilizado el medio Cleavage (SAGE) hasta D+3. Las condiciones del incubador han sido 6% CO<sub>2</sub> - 37°C.

La prueba de embarazo se realizó 14 días después de la transferencia y la primera ecografía de gestación a los 15 días después de la β-hCG.

Para cada variable se han formado 4 grupos basados en los Cuartiles y se ha determinado la tasa de implantación de cada uno (tasa de implantación subestimada, dado que sólo se tienen en cuenta embriones con trazabilidad). Esto ha servido para encontrar los puntos de corte o rangos óptimos de cada variable. La significación se ha determinado mediante una χ<sup>2</sup>.

## RESULTADOS

Como se observa en el gráfico adjunto, para todas las variables se han

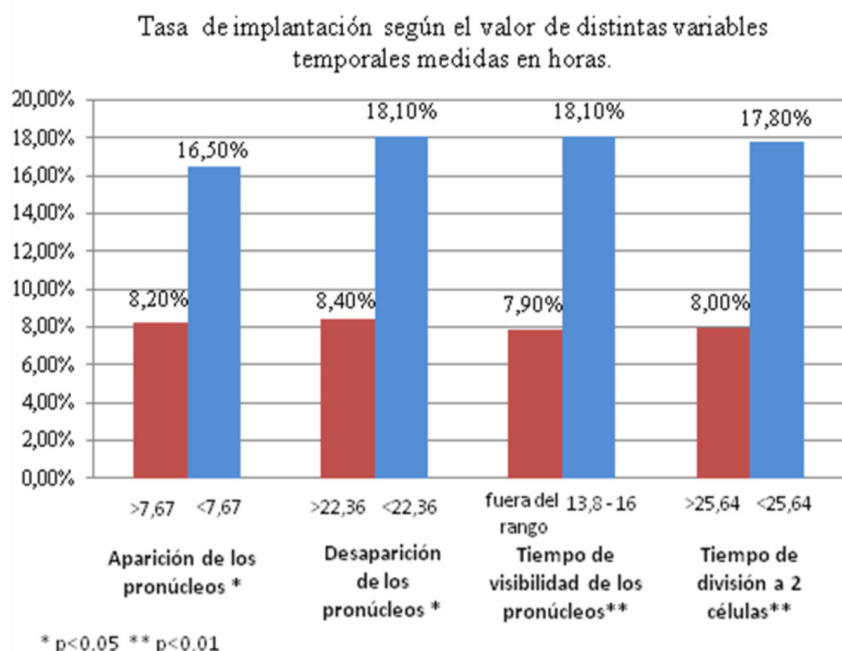
encontrado diferencias significativas en la tasa de implantación de cada grupo.

## CONCLUSIONES

En este estudio hemos observado importantes diferencias en los patrones temporales de desarrollo temprano entre los embriones que implantan y los que no. La aparición y desaparición de los pronúcleos parece contener información relevante a añadir a otros sistemas de clasificación. Estos valores deberán contrastarse, en un futuro, con nuevos embriones que no han servido de base para el estudio. Esto aportaría validez externa a la investigación.

## BIBLIOGRAFÍA

Messeguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remohí J. "The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation" Hum Reprod 2011; 0:1-14.



## 0-014: CRIOTRANSFERENCIA DE EMBRIÓN ÚNICO: ¿ES NECESARIA? ¿ES EFICAZ?

J.A. Castilla Alcalá; S. Carrillo; A. Clavero; B. López; M. Serrano; I. Orozco; A. Mantilla; M.A. Calderón.  
Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada  
[s.carrilloluca@gmail.com](mailto:s.carrilloluca@gmail.com)

### INTRODUCCIÓN

Son numerosos los trabajos de transferencia de embrión único (SET) en fresco, siendo escasos aquellos que se plantean analizar esta posibilidad en criotransferencias.

Las mejoras en las técnicas de vitrificación embrionaria han hecho que esta opción deba ser analizada para evitar el embarazo múltiple tras criotransferencia.

### OBJETIVO

Analizar la tasa de embarazo único en criotransferencia y el impacto que tendría en la tasa de embarazo múltiple en un programa de criotransferencias de embrión único desvitrificado.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizan 435 pacientes en el periodo desde 2010 hasta febrero de 2013 y las 526 criotransferencias realizadas y las dividimos en tres grupos:

- **Grupo DFET (Double frozen embrio transfer):** 247 pacientes y 314 criotransferencias de dos embriones.
- **Grupo Non-eSFET (Non elective Single frozen embrio transfer):** 153 pacientes y 171 criotransferencias de un embrión en parejas no seleccionadas y sin posibilidad de elegir embrión.
- **Grupo eSFET (elective Single frozen embrio transfer):** 35 pacientes y 41 criotransferencias de un embrión en parejas seleccionadas, criterios de inclusión en el momento de ciclo en fresco: edad de la mujer menor de 38 años; índice de masa corporal 19 y 29 kg/m<sup>2</sup> y FSH menor de 15mUI/ml al tercer día del ciclo; primer ciclo de FIV/ICSI o segundo con un embarazo

no a término. Criterios de exclusión: más de cinco años de esterilidad, intervenciones quirúrgicas previas (miomas, endometriosis, hidrosalpinx) malformaciones uterinas, abortos de repetición (2 o más abortos consecutivos) y ciclos de FIV/ICSI previos sin éxito.

Los embriones son criopreservados el tercer día (D+3) mediante vitrificación. Se utilizarán los medios comerciales de vitrificación (Medicult Vitrification, Denmark) y el dispositivo de almacenamiento Cryoleaf (McGill Cryoleaf, Origio, Denmark). El día anterior a la criotransferencia los embriones se desvitrifican, utilizando el kit de desvitrificación (Origio Warming, Denmark). Por lo que la criotransferencia se realiza en D+4, lo que nos permite observar si hay división embrionaria postdesvitrificación.

### RESULTADOS

No existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la tasa de supervivencia entre los grupos DFET y eSFET (90.3% y 93.2%), mientras que sí hay diferencias significativas con el grupo Non-eSFET (79.5%). En el caso del grupo DFET se obtienen diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) en su tasa de embarazo múltiple (33.3%) comparado con los demás grupos (0%), siendo no significativa la diferencia en tasas de gestación evolutiva entre los tres grupos 22.9% en el grupo DFET, 14.0% en el grupo Non-eSFET y 21.9% en el eSFET

### CONCLUSIONES

Las diferencias significativas en el caso de la tasa de división embrionaria se pueden deber a que en el grupo Non-eSFET la media de calidad embrionaria es inferior a los demás grupos. Dada

la alta tasa de embarazo múltiple en nuestro programa de criotransferencias y a la vista de los resultados clínicos obtenidos en este estudio sobre criotransferencias, podemos inferir que en parejas seleccionadas es razonable una política de eSFET, ya que los resultados son similares al DFET y sin embargo la tasa de gestación múltiple se vería muy reducida.

## O-015: DETERMINACIÓN DEL PERFIL METABOLÓMICO DEL MEDIO DE CULTIVO EMBRIONARIO COMO POSIBLE MARCADOR NO INVASIVO DE CALIDAD EMBRIONARIA MEDIANTE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

I. Cuevas<sup>1</sup>; A. Sáez<sup>1</sup>; A. Coello<sup>1</sup>; J.M. Morales<sup>2</sup>; D. Monleón<sup>3</sup>; C. Olmedo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Reproducción Humana. Hospital General Universitario de Valencia. Valencia.

<sup>2</sup>Unidad Central de Investigación en Medicina- INCLIVA.

<sup>3</sup>Fundación del Hospital Clínico de Valencia -INCLIVA

[icuevassaiz@yahoo.es](mailto:icuevassaiz@yahoo.es)

### INTRODUCCIÓN

Los criterios de clasificación embrionaria, hasta la fecha, han sido básicamente morfológicos, con el inconveniente de la subjetividad de los mismos. En la actualidad se están desarrollando nuevas técnicas no invasivas de selección embrionaria con la finalidad de objetivar dicho proceso e implantar la transferencia embrionaria única sin ver mermados los resultados.

### OBJETIVOS

El objetivo de este estudio es relacionar la variación en los niveles de ciertos metabolitos en el medio de cultivo con el potencial de implantación embrionario, con el fin de encontrar biomarcadores no invasivos de calidad embrionaria. Esto nos permitiría seleccionar los embriones con mayor potencial de implantación basándonos no solo en criterios morfológicos. Con ello se pretende aumentar las tasas de embarazo y reducir la tasa actual de gestación múltiple.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se recuperaron los medios de cultivo de los embriones transferidos a pacientes que realizaron un ciclo de fecundación in Vitro en la Unidad de Reproducción Humana. Para obtener el perfil metabolómico se realizó el análisis retrospectivo del medio de cultivo en el que habían permanecido los embriones desde el día en el que se valoró la fecundación hasta el momento de la transferencia en día 2 de cultivo embrionario (entre 18 – 22 horas de cultivo embrionario). El medio

utilizado para el cultivo fue G1 PLUS serie 5 (Vitrolife®). Dichos medios se mantuvieron congelados a -80°C hasta su análisis, sin necesidad de dilución, mediante RMN. Paralelamente se llevó a cabo un seguimiento de los embriones incluidos en el estudio para ver si implantaron o no. Los espectros de RMN se analizaron mediante técnicas quimiométricas y de análisis multivariable para encontrar patrones metabólicos diferenciales entre grupos. Concretamente se procesaron usando MestReNova 5.3 (Mestrelab Research S.L., España), transferidos a MATLAB

(MathWorks Inc, 2006).

### RESULTADOS

Se incluyeron en el análisis un total de 87 muestras de las que se conocía el destino del embrión (16 implantados, 71 no implantados). Se obtuvieron un total de 9 regiones del espectro que participaban en el modelo discriminante PLS-DA. De las 9 regiones, 3 se correspondían a metabolitos que hacían discriminar de forma estadísticamente significativa 2 perfiles metabolómicos. De los 3 metabolitos, 2 de ellos eran aminoácidos ya presentes en el medio de cultivo original y modificados por los embriones de forma diferencial en función de su poder implantatorio. El otro metabolito es un ácido graso que apareció de novo (no presente en el medio), y no descrito hasta la fecha en bibliografía de Reproducción Humana. Dicho metabolito está implicado en procesos como diferenciación celular, apoptosis y regulación de la actividad transcripcional.

### CONCLUSIONES

La utilización de microsondas de RMN y de técnicas de análisis multivariable nos ha permitido desarrollar un modelo discriminatorio de implantación embrionaria. Los resultados obtenidos en cuanto a la modificación de aminoácidos presentes en el medio de cultivo, coincide con lo ya publicado por otros grupos. En cambio, el ácido graso encontrado en nuestro estudio no ha sido descrito hasta la fecha en bibliografía de Reproducción Humana. Dicho metabolito está implicado en procesos como diferenciación celular, apoptosis y regulación de la actividad transcripcional. Los resultados obtenidos hasta la fecha se deben validar con estudios prospectivos.



## O-016: VALORACIÓN DEL CRECIMIENTO Y DESARROLLO PSICOMOTOR EN NIÑOS DE 1 A 6 AÑOS NACIDOS TRAS VITRIFICACIÓN EMBRIONARIA

M. Ferrer-Buitrago <sup>1,2</sup>, P. Muñoz-Soriano <sup>1,2</sup>, E. Ferrer-Robles <sup>1,2</sup>, J. López-Camarasa <sup>3</sup>, M. Muñoz-García, M. Ruiz-Jorro <sup>1,2</sup>, C. Calatayud-Lliso <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> CREA. Centro médico de reproducción asistida, València.

<sup>2</sup> ANACER. Asociación nacional de clínicas de reproducción asistida.

<sup>3</sup> Equipo de pediatría del Centre de Salut de Sueca. València.

[minerva.ferrer@creavalencia.com](mailto:minerva.ferrer@creavalencia.com)

### INTRODUCCIÓN

La vitrificación de embriones es una técnica introducida progresiva y exitosamente en la práctica de la embriología clínica al largo de los últimos años. Ha mostrado ser un procedimiento sencillo por su fácil adaptación al laboratorio así como por la optimización del tiempo de trabajo. Los resultados en tasas de supervivencia, implantación y reanudación mitótica se utilizan frecuentemente para manifestar su eficacia, y la seguridad se ha reflejado en tasas de recuperación tras desvitrificación o bien, se ha centrado en el diseño de protocolos y soportes que eviten el riesgo de contaminación a través del nitrógeno líquido. Sin embargo, la evaluación de la seguridad de una nueva técnica en RA, debe además contemplar la posible repercusión a largo de plazo en el desarrollo del niño. Existen trabajos de seguimiento en niños nacidos tras FIV/ICSI (Bonduelle 1998, 2003; Van Steirteghem 2002) así como de niños nacidos tras PGS/PGD (Nekkebroeck 2008; Schendelaar 2013) Hasta la fecha, los resultados en vitrificación muestran datos perinatales y obstétricos. Poco más de 10 años después de la publicación del primer nacimiento de un niño tras vitrificación (Mukaida 2001), es necesaria la realización de seguimientos pediátricos continuados que valoren el crecimiento y el desarrollo psicomotor y cognitivo de estos niños. El presente estudio muestra datos de seguimiento pediátrico de 38 niños nacidos tras vitrificación entre 2006 y 2012.

### OBJETIVOS

Evaluación de la seguridad de la vitrificación de embriones a través de la

valoración del crecimiento y desarrollo psicomotor de niños nacidos mediante esta técnica.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se hicieron 3 grupos según recomendación pediátrica: Grupo A: de 12 a 24 meses, Grupo B: de 2 a 3 años, Grupo C: de 3 a 6 años. Se registraron datos de biometría (peso y talla). Se evaluaron características motoras, motoras finas-adaptativas, habilidades del lenguaje y personales-sociales mediante las pruebas de cribado: test de Denver (DDST-II) y evaluación de hitos del desarrollo. El resultado nos permite identificar una evolución lenta del niño, y recomendar entonces, un estudio pediátrico más exhaustivo.

### RESULTADOS

Se presentan datos de seguimiento pediátrico en 38 niños nacidos tras vitrificación. El 81.58% (31/38) de los casos provienen de embriones vitrificados en D+3. El resto se vitrificaron en PNs (1/38), en D+4 (4/38) y en blastocisto D+5 (2/8).

Valoración biométrica: Se calculó, para el total, la media de semanas gestacionales (36.08±3.58) y las medias de peso (kg) y talla (cm) neonatales: 2.75±0.73 y 47.63±3.68, respectivamente. Se calcularon las medias de peso (kg) y talla (cm) en cada grupo: A) 10.77±1.4 y 81.89±3.87 B) 12.74±1.25 y 91.64±5.95; C) 18.76±2.56 y 112.4±21.57. Todos los datos se encuentran dentro del rango de normalidad de los patrones crecimiento descritos por la OMS (2003)

Valoración del desarrollo psicomotor: En el grupo A, aunque se observaron leves

matices dudosos en las habilidades del lenguaje y características personales-sociales en 8 de los 13 casos estudiados, no siendo considerados como perfiles anormales, dada la rápida adaptabilidad de los niños en este rango de edad. Los demás grupos también presentaban un perfil de desarrollo psicomotor global dentro de la normalidad, sin signos de alarma ni indicación de aparición temprana de autismo.

### CONCLUSIÓN

Según nuestros resultados, el perfil de crecimiento y desarrollo psicomotor de niños nacidos tras vitrificación embrionaria, se corresponde con los parámetros de normalidad. En consecuencia, la vitrificación de embriones se presenta, de nuevo, como una técnica segura.

El seguimiento continuado de niños nacidos tras nuevas técnicas de reproducción es de máximo interés para establecer la seguridad de la técnica, así como para identificar sus posibles consecuencias a largo plazo en esta descendencia.

## O-017: EFICACIA DE UNA POLÍTICA DE TRANSFERENCIA EMBRIONARIA ÚNICA CON CRIOTRANSFERENCIA DE EMBRIÓN ÚNICO: ¿ES POSIBLE SU IMPLANTACIÓN EN EL SISTEMA SANITARIO PÚBLICO?

M.L. López Regalado; A. Clavero; M.C. Gonzalvo; S. Carrillo; B. López; M. Serrano; I. Orozco; M. Rodríguez.  
Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada  
[marisalopezregalado@gmail.com](mailto:marisalopezregalado@gmail.com)

### INTRODUCCIÓN

La transferencia electiva de un embrión (eSET) constituye el medio más eficaz en la reducción de los embarazos gemelares en Reproducción Asistida. Sin embargo, queda mucho camino para su implantación definitiva en nuestro país, y aún más en el medio público. En 2010 según la Sociedad Española de Fertilidad el 69,4% de las transferencias fueron de 2 embriones siendo la transferencia única (electiva y obligada) sólo del 17,4%. Por ello, sería necesaria la realización de ensayos clínicos que apoyen el uso de esta estrategia.

### OBJETIVOS

Demostrar la eficacia de una estrategia de eSET en la que se incluye la criotransferencia de un único embrión realizada en un programa consolidado de criopreservación mediante vitrificación.

### MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se ha diseñado como un ensayo clínico prospectivo y aleatorizado, durante el período de Enero 2010 – Diciembre 2012 en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada que incluye a un total de 175 parejas de buen pronóstico (mujeres menores de 38 años, IMC 18,5-29kg/m<sup>2</sup>, sin abortos de repetición, sin intervenciones quirúrgicas previas ni malformaciones uterinas). Todas las pacientes seguirán un tratamiento de estimulación de la ovulación mediante protocolo de análogo largo o antagonista. Tras la recuperación ovocitaria se realiza microinseminación espermática (ICSI), transfiriéndose el/los embriones obtenidos al segundo ó tercer día. Las parejas se asignan aleatoriamente al

grupo eSET: transferencia electiva de un embrión (eSET) seguida, en caso de no quedar embarazada, de un ciclo de criotransferencia de embrión único o al grupo DET: transferencia electiva de dos embriones (DET).

El resultado primario fue la tasa de gestación clínica que se definió como observación de saco embrionario con latido cardíaco a las siete semanas gestacionales; los resultados secundarios fueron la tasa de embarazo evolutivo (> 28 semanas) y tasa de embarazo múltiple (observación de 2 o más sacos embrionarios). Se analizaron variables epidemiológicas (edad de la mujer, tiempo y causa de esterilidad); variables de respuesta a la estimulación (dosis de FSH administrada, niveles de estradiol el día de la hCG, días de estimulación) y variables de laboratorio (nº de ovocitos obtenidos, tasa de fecundación, calidad embrionaria) para evaluar la homogeneidad de los grupos.

### RESULTADOS

No se observan diferencias significativas ni en las variables epidemiológicas ni en el protocolo y respuesta a la estimulación, ni en las variables de laboratorio. De las 175 parejas aleatorizadas, se produjeron 54 pérdidas (27 en cada grupo). Por tanto, se analizaron un total de 121 pacientes, 57 en el grupo eSET y 64 en el grupo DET. No hubo diferencias significativas en la tasa de gestación clínica acumulada (49,1% eSET vs 46,9% DET). Sí encontramos diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la tasa de embarazo múltiple que fue drásticamente reducida en el grupo eSET con respecto al grupo DET (0% vs 26,7% respectivamente). La tasa de embarazo evolutivo por ciclo no fue estadísticamente diferente siendo en eSET del 19,1% frente al 22% en DET.

### CONCLUSIONES

La política de eSET no disminuye las tasas de gestación clínica acumulada ni las de embarazo evolutivo reduciendo drásticamente las tasas de gestación gemelar, siempre que se aplique a una población seleccionada. Creemos que este estudio apoya la implantación de dicha estrategia de transferencia embrionaria en el sistema sanitario público.

## 0-018: PREVALENCIA DE LOS POLIMORFISMOS CROMOSÓMICOS EN PACIENTES INFÉRTILES Y SU EFECTO EN LOS RESULTADOS DE LOS CICLOS FIV

R. Morales; B. Lledo; J.A. Ortiz; J. Ten; J. Llacer; R. Bernabeu.  
Instituto Bernabeu Biotech, Alicante  
[rmorales@institutobernabeu.com](mailto:rmorales@institutobernabeu.com)

### INTRODUCCIÓN

Las alteraciones cromosómicas estructurales son alteraciones genéticas comunes en humanos y son responsables de problemas reproductivos como infertilidad o abortos de repetición (RPL). Las variantes cromosómicas polimórficas o polimorfismos cromosómicos son consideradas normales ya que afectan a regiones de heterocromatina y se encuentran presentes en población general sin significación clínica. Sin embargo, en estudios previos se ha evidenciado una mayor incidencia de estas variantes en pacientes infértiles como parejas con RPL o varones con alteraciones seminales.

### OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue correlacionar los polimorfismos cromosómicos con la infertilidad y analizar su efecto sobre los resultados del ciclo.

### MATERIAL Y MÉTODOS

En el presente trabajo se incluyeron 1551 cariotipos llevados a cabo desde 2009 hasta 2012, el grupo de estudio estaba formado por pacientes infértiles (n=866) y el grupo control donantes de ovocitos/semen (n=685). La tasa de aneuploidías seminal fue evaluada mediante Hibridación in situ fluorescente (FISH) en 145 pacientes infértiles empleando sondas para los cromosomas X,Y, 18, 13 y 21. Se analizaron los resultados del ciclo de FIV de 259 pacientes.

### RESULTADOS

Se observó un incremento estadísticamente significativo en

la frecuencia de polimorfismos cromosómicos en la población infértil frente a los controles (16.9% vs 12.8% s;  $p<0.05$ ). Analizando cada variante de forma independiente observamos que los polimorfismos 9qh+ y Yqh+ presentaban mayor prevalencia en el grupo de estudio ( $p<0.05$ ). La frecuencia de polimorfismos en los pacientes RPL fue de 24.1%, comparado con 12.8% en la población control ( $p<0.05$ ). También se observaron diferencias en las tasas de aneuploidías seminales entre varones infértiles con y sin polimorfismos cromosómicos (37,7% vs 16,3%;  $p<0.05$ ), sin embargo no se evidenció tal relación con la calidad seminal. En cuanto a los resultados de los ciclos de FIV, las tasas de aborto bioquímico y clínico fueron mayores en los pacientes sin RPL portadores de polimorfismos frente a pacientes con cariotipo normal (35.6% vs 22.7% aborto bioquímico y 20.7% vs 9.8% aborto clínico).

### CONCLUSIONES

Se ha demostrado que la prevalencia de polimorfismos cromosómicos es mayor en pacientes infértiles que en población fértil. Así mismo, la presencia de estas variantes es mucho mayor en pacientes con abortos de repetición. De hecho, pacientes sin abortos de repetición que se someten a un tratamiento de reproducción tienen mayor riesgo de abortos cuando son portadoras de polimorfismos. Los varones portadores de polimorfismos tienen mayor incidencia de aneuploidías seminales. Todos estos hallazgos ponen de manifiesto que los polimorfismos cromosómicos están asociados con la infertilidad y deben ser considerados antes de comenzar un tratamiento de reproducción asistida.

## O-019: EL TIPO DE ANOMALÍA CROMOSÓMICA AFECTA AL TIEMPO DE DIVISIÓN EMBRIONARIA

M C Nogales<sup>1</sup>; M. Florensa<sup>2</sup>; N. Basile<sup>1</sup>; M. Ariza<sup>1</sup>; E. Martínez<sup>1</sup>; D. Agudo<sup>1</sup>; M. Meseguer<sup>2</sup>; F. Bronet<sup>1</sup>

<sup>1</sup> IVI Madrid, Avenida del Talgo, 68; 28023 Aravaca (Madrid).

<sup>2</sup> IVI Valencia, Valencia.

<sup>3</sup> IVI Barcelona, Barcelona.

[Mamen.Nogales@ivi.es](mailto:Mamen.Nogales@ivi.es)

### INTRODUCCIÓN

El análisis no invasivo de embriones basado en la tecnología del time-lapse nos ha aportado nuevos marcadores para seleccionar los embriones óptimos. Existen diversos factores tanto intrínsecos como extrínsecos que modifican la cinética embrionaria. Entre los factores intrínsecos puede estar la dotación cromosómica del embrión.

### OBJETIVOS

Comparar la cinética embrionaria según el tipo de anomalía cromosómica (monosomías, trisomías y complejas) con los embriones normales e intentar construir un modelo en base a las variables cinéticas que nos pueda predecir si un embrión es anormal.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Un total de 128 ciclos de pacientes a los que se les realizó diagnóstico genético preimplantacional por fallo de implantación o aborto de repetición fueron incluidos en este estudio.

Fueron biopsiados 478 embriones en día 3 de desarrollo analizándose por hibridación genómica comparada (array cGH). Tomando como control los embriones normales se evaluaron tres grupos de estudio según la anomalía cromosómica, embriones con monosomías, trisomías y los complejos, es decir, aquellos que presentaban más de un cromosoma alterado. Se realizan capturas digitales de imágenes a los embriones en intervalos de tiempo preprogramados. El tiempo y la duración de las divisiones embrionarias son analizadas mediante un software.

El tiempo de división embrionaria fue grabado y almacenado en horas y

evaluamos los siguientes marcadores para las divisiones embrionarias: 1º (2 células, t2), 2º (3 células, t3), 3º (4 células, t4), 4º (5 células, t5) y 6º (6 células, t6) M (mórula) y B (blasto) Se estudió la duración del segundo y tercer ciclo celular, definiéndose como  $cc2=t3-t2$  y  $cc3=t5-t3$ . Y también el tiempo transcurrido desde que el embrión tiene dos células hasta que pasa a cinco ( $t5-t2$ ) englobando dos ciclos celulares.

### RESULTADOS

Los embriones con trisomías mostraban una cinética muy parecida a los embriones normales para todas las variables estudiadas, no habiendo diferencias estadísticamente significativas. Los embriones con monosomías presentaron una situación intermedia entre los complejos y los normales. En cambio los embriones complejos mostraban divisiones más rápidas que los embriones normales. Su diferencia fue estadísticamente significativa para las variables t3, t5, cc2, cc3 y t5-t2. Esto hace posible determinar el rango óptimo para las variables  $t3 > 34,72$  horas,  $t5 > 45,86$  horas,  $cc2 > 11$  horas,  $cc3 > 11,54$  horas y  $t5-t2 > 21,01$  horas. Aplicando una regresión logística podemos saber cuáles de estas variables son las mejores para distinguir entre embriones normales y embriones aneuploides complejos. El resultado fue que la variable t3 (OR=0,590 IC95% 0,359-0,971) y la variable t5-t2 (OR=0,151 IC95% 0,082-0,278) son las mejores para predecir si un embrión es normal o anormal complejo. Con ellas hemos elaborado un sistema de clasificación de naturaleza jerárquica que permite distinguir 4 categorías de embriones con distintas probabilidades de ser cromosómicamente normales

con la siguiente distribución; A=70.1% B=62.6%, C= 35.6% y D=14.6%.

### CONCLUSIONES

El uso del diagnóstico genético preimplantacional junto con el time-lapse nos permite obtener más información acerca de las diferencias en la cinética entre embriones normales y anormales y dentro de éstos últimos cómo se comportan dependiendo del tipo de anomalía cromosómica. Un modelo de regresión logística basado en las variables cinéticas se puede proponer para seleccionar embriones con alta probabilidad de tener anomalías complejas, no podría sustituir al diagnóstico genético debido a que existen embriones con trisomías que se comportan como los embriones normales, pero sí que nos sería útil para aumentar las posibilidades de implantación en pacientes no susceptibles de diagnóstico genético preimplantacional. El algoritmo podría ayudar a escoger los embriones a los que hacer el diagnóstico en casos de pacientes con recursos limitados o también en casos en los que el DGP no está disponible reduciendo la probabilidad de transferir embriones con anomalías cromosómicas.



# O-020: UTILIDAD CLÍNICA DEL ARRAY-CGH EN EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL DE PAREJAS PORTADORAS DE REORDENAMIENTOS CROMOSÓMICOS ESTRUCTURALES: UN SALTO CUALITATIVO

E. Fernández <sup>1</sup>; P. Eibes <sup>1</sup>; A. Gómez <sup>1</sup>; A. Obradors <sup>2</sup>; A. Pujol <sup>2</sup>; J. Muñoz <sup>3</sup>; M. Martínez-Fresno <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Geniality Diagnóstico Genético, Madrid; <sup>2</sup> Clínica Eugén, Barcelona; <sup>3</sup> Instituto Madrileño de Fertilidad, Madrid  
[efgarcia@geniality.es](mailto:efgarcia@geniality.es)

## INTRODUCCIÓN

Los reordenamientos cromosómicos equilibrados representan una de las indicaciones más frecuentes para el diagnóstico genético preimplantacional (DGP). Este estudio describe la aplicación clínica de la hibridación genómica comparada mediante array-CGH (24surev3 y 24sure+), para analizar simultáneamente los desequilibrios derivados de reordenamientos cromosómicos y las aneuploidías de los 24 cromosomas.

## OBJETIVOS

Evaluación mediante el análisis de las tasas de embarazo de la técnica de array-CGH como método diagnóstico y de selección embrionaria en el Diagnóstico Genético Preimplantacional de anomalías cromosómicas estructurales.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio incluye a 22 pacientes, media de edad de la mujer 35 años (25-41), de 11 centros distintos, para 19 reordenamientos cromosómicos equilibrados diferentes (inversiones o robertsonianas), 9 de ellos paternos y 13 maternos, que se sometieron a 26 ciclos de DGP (2 ovodonación) con un total de 177 embriones. Se llevó a cabo la biopsia embrionaria de una sola célula en día +3, y tras la lisis celular, se amplificó el ADN mediante la técnica de *whole genome amplification* (Sureplex). El producto amplificado fue procesado usando el protocolo para array-CGH 24sureV3 y array-CGH 24sure+ y las imágenes analizadas con el software BlueFuse (BlueGnome, Cambridge UK). Los

embriones diploides/equilibrados fueron seleccionados para su transferencia en el día 5 del mismo ciclo.

## RESULTADOS

De un total de 177 embriones biopsiados, se obtuvo resultado en 166 (93,8%). De las muestras diagnosticadas, el 48% de los embriones presentaron alteraciones asociadas con el reordenamiento, solas o en combinación con otras anomalías cromosómicas. El 32,7% de los embriones fueron equilibrados para los cromosomas implicados en el reordenamiento, pero presentaban aneuploidías en otros cromosomas. Únicamente el 19,3% de los embriones fueron cromosómicamente normales y/o equilibrados. En aquellos casos donde el portador del reordenamiento era el varón, el porcentaje de embriones equilibrados fue del 24,7%, mientras que cuando la mujer era la portadora, fue del 9,8%.

Hubo transferencia en 13 ciclos (50%), en 9 (69,3%) de las transferencias el varón era el portador del reordenamiento y en las 4 restantes (30,7%) la mujer. Se transfirieron un total de 20 embriones (media 1,53). De las 22 parejas que completaron sus ciclos de tratamiento, 7 (31,8%) obtuvieron embarazo después de una, o dos transferencias. De estas, en cuatro casos el varón era el portador y en los otros tres era la mujer. La tasa de embarazo por ciclo fue del 26,9%, siendo la tasa de embarazo por transferencia del 53,8% y la tasa de implantación del 40% (Tabla I).

## CONCLUSIONES

La incorporación del array-CGH ha hecho posible que la mayoría de los

pacientes que solicitan DGP para un reordenamiento cromosómico pueden ser tratados con un único protocolo. El array-CGH detecta desequilibrios cromosómicos en embriones y también proporciona la ventaja añadida del cribado de aneuploidías simultáneo de todos los cromosomas.

Del 52% de embriones equilibrados (segregación 2:2 alterna), solo el 19,3% de los embriones son diploides/equilibrados y aptos para la transferencia ya que el 32,7% de los embriones equilibrados presentan aneuploidías en otros cromosomas, lo que pone de manifiesto un efecto intercromosómico que hace necesario en este tipo de pacientes el análisis de todo el complemento cromosómico.

Existe un mejor pronóstico en la tasa de embarazo en los ciclos donde el portador del reordenamiento es el varón (n=9) frente a la mujer (n=13), 44% vs 23%, sin embargo queda demostrado que cuando se transfieren embriones diploide/equilibrado la tasa de embarazo/transferencia y de implantación es independiente del origen paterno/materno del portador.

El array-CGH muestra una alta utilidad clínica en esta indicación como método de selección de embriones mejorando e incrementando significativamente las tasas de embarazo por transferencia (53,8%) y de implantación (40%).

## O-021: VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA KARYOLITE-BOBS COMO MÉTODO DE DGP DE SCREENING DE ANEUPLOIDÍAS DE 24 CROMOSOMAS

M. Martínez-Fresno; A. Gómez; P. Eibes; E. Sánchez; E. Fernández  
Geniality Diagnóstico Genético, Madrid  
[mmfresno@geniality.es](mailto:mmfresno@geniality.es)

### INTRODUCCIÓN

En los últimos 5 años, la tecnología array-CGH (aCGH) se ha establecido como una herramienta diagnóstica de primer orden para el Screening de aneuploidías en Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) permitiendo mejorar las tasas de implantación y embarazo en diversas indicaciones. La principal ventaja de la técnica de aCGH es que permite analizar los 24 cromosomas mediante la inclusión en el array de más de 3.000 sondas de ADN procedentes de Cromosomas Artificiales Bacterianos (BAC) repartidos en el total de cromosomas. Desde el año 2011, se ha comenzado a aplicar al diagnóstico prenatal la técnica Karyolite-BoBs para el diagnóstico de alteraciones cromosómicas numéricas en los 24 cromosomas demostrando su utilidad clínica. Esta técnica, se basa en la tecnología BACs-on-Beads que emplea sondas tipo BAC fijados en microesferas Luminex®. Incluye 91 microesferas cada una de las cuales tiene 3 BACs, un total de 273 BACs, que mapean en las regiones proximales y terminales de cada brazo de los 24 cromosomas. Las muestras marcadas y los ADN de referencia se hibridan con las mismas sondas BACs complementarias. Tras la hibridación se leen las intensidades mediante el sistema Luminex.

### OBJETIVO

Validación de la técnica KaryoLite-BoBs como método de DGP de Screening de Aneuploidías mediante el análisis de la sensibilidad y especificidad analítica en muestras estudiadas previamente mediante aCGH

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron 13 muestras de amplificadas de Whole Genome

Amplification (Sureplex) procedentes de blastómeros biopsiados (día+3) que habían sido diagnosticados con éxito mediante aCGH (24sureV3) y se llevo a cabo el protocolo de Karyolite-BoBs según indica el fabricante (Perkin-Elmer). El análisis de los resultados se llevo a cabo mediante el software de análisis BoBsoft 2.0

### RESULTADOS

En las 13 muestras analizadas se obtuvo un diagnóstico clínico (trasferibles/no transferible) igual al obtenido previamente mediante aCGH. Todas las muestras mostraron un perfil equivalente con respecto a los cromosomas sexuales (XX/XY). En cuanto al diagnóstico genético cromosoma a cromosoma (n=312), únicamente se encontraron discrepancias en dos embriones aneuploides complejos, clasificando como aneuploide complejo aquel embrión que presentara más de 3 aneuploidías. Definiendo la sensibilidad analítica como la proporción de cromosomas que presentan una aneuploidía y que se clasifican correctamente como tales con la técnica KaryoLite-BoBs, esta técnica presento una sensibilidad analítica del 92,85% (26/28), ya que hubo 2 aneuploidías en embriones aneuploides complejos no detectadas por la técnica KaryoLite-BoBs. Se analizó también la especificidad analítica, como la proporción de cromosomas que no presentan ninguna alteración mediante aCGH, correctamente clasificadas mediante la técnica KaryoLite-BoB, presentando esta técnica una especificidad analítica del 99,64% (283/284).

### CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos apuntan a que la técnica KaryoLite-BoBs puede

constituir una alternativa al aCGH, sin embargo este estudio de validación necesita ser ampliado al análisis de un mayor número de muestras para confirmar su aplicación en clínica. La técnica KaryoLite-BoBs presenta un coste de análisis significativamente menor al aCGH por lo que podría constituir una alternativa válida al análisis de aneuploidías mediante FISH ya que no solo presenta ventajas en cuanto a cobertura cromosómica sino también en cuanto a automatización del proceso y objetividad analítica. Además, esta técnica mejoraría la selección de embriones en el DGP de enfermedades monogénicas en aquellas pacientes mayores de 35 años, ya que permitiría realizar el Screening de Aneuploidías en paralelo al diagnóstico de la enfermedad a precios competitivos. Por otro lado este estudio preliminar de validación se ha llevado a cabo en amplificadas de célula única procedente de biopsia en día 3, sin embargo tal y como ocurre con otras técnicas en DGP la sensibilidad analítica se vería incrementada en día 5 debido a la mayor disponibilidad de ADN en la biopsia de trofoectodermo.

## O-022: GENOTIPADO DEL SNP R72P DEL GEN P53 EN PACIENTES CON FALLO DE IMPLANTACIÓN Y ABORTO DE REPETICIÓN Y SU EFECTO EN LOS RESULTADOS DE LOS CICLOS DE FIV

B. Lledo; A. Turienzo; J.A. Ortiz; R. Morales; J. Ten; J. Llacer; R. Bernabeu.  
Instituto Bernabeu Biotech, Alicante  
[blledo@institutobernabeu.com](mailto:blledo@institutobernabeu.com)

### INTRODUCCIÓN

La implantación embrionaria requiere de la habilidad del blastocisto de invadir el endometrio. Tras los efectos conjuntos y equilibrados de factores de crecimiento y apoptóticos se consigue una invasión trofoblástica adecuada. La actividad biológica de p53 se ve afectada por un codón polimórfico en posición 72 del gen. La capacidad de inducción de la apoptosis y la supresión de la transformación celular de la variante R72 en la proteína codificada por p53 es mucho mayor que la de P72. Estudios previos han puesto de manifiesto que el polimorfismo R72P del gen p53 puede ser un factor de riesgo para el fallo de implantación.

### OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo ha sido determinar la prevalencia del polimorfismo Arg72Pro (R72P) del gen p53 en pacientes con fallo de implantación (RIF) y abortos de repetición. Así como, determinar el efecto de cada genotipo sobre los resultados de los ciclos de FIV.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha determinado el polimorfismo P72 en 181 mujeres. El grupo control incluye 83 donantes de ovocitos. El grupo de estudio está formado por 98 pacientes de las cuales 44 son pacientes con historias previas de fallo de implantación (RIF) y 54 de abortos de repetición (RPL). El grupo RIF incluye pacientes en las que se han transferido en ciclos FIV previos al menos 4 embriones de buena calidad y no se ha conseguido embarazo. Y en el grupo RPL se incluyen pacientes con al menos dos abortos clínicos. Del grupo de estudio

70 pacientes (43RPL y 27 RIF) llevaron a cabo ciclos de FIV. Para el genotipado se empleó el kit TaqMan prediseñado para el SNPs rs1042522 (Life Technologies Corporation). La estadística se realizó empleando el software SPSS y el test chi-cuadrado para las variables categóricas, y regresiones lineales para las continuas con una significación de 0.05.

### RESULTADOS

La frecuencia de los genotipos P72/P72 en el gen p53 en pacientes RIF fue del 11.4% comparado con el 18,5% de pacientes RPL y el 6% de controles ( $p < 0.01$ ). No se observan diferencias significativas en la edad de las pacientes, el número de ovocitos recuperados, el número total de embriones y el número de embriones transferidos. Se observan diferencias significativas en las tasa de beta-HCG positiva (73.3% para RR, 67.6% para RP y 33.3% para PP;  $p < 0.05$ ), tasa de implantación (36.6% para RR, 43.3% para RP y 19.6% para PP;  $p < 0.05$ ) y tasa de embarazo evolutivo (46.7% para RR, 52.9% para RP y 14.3% para PP;  $p < 0.05$ ) entre las pacientes RIF y RPL. El polimorfismo P72 en el gen p53 correlaciona con los resultados del ciclo cuando el grupo de estudio se divide en pacientes RIF y RPL ( $p < 0.05$ ).

### CONCLUSIONES

Esta investigación revela que en los pacientes RIF y RPL el genotipo P72 en el gen p53 es más prevalente que en la población fértil. Además las pacientes portadoras del genotipo PP en el codón 72 del gen p53 tienen menos probabilidades de conseguir un embarazo evolutivo. Esta información junto con otros marcadores permitirá desarrollar nuevos test diagnósticos

para detectar el riesgo de RIF y RPL en pacientes antes de comenzar los tratamientos de reproducción. Por todo ello, podemos concluir que el genotipado p53 es un factor importante para determinar el éxito del ciclo FIV en pacientes RIF y RPL.

## O-023: DGP COMBINADO DE DOS ENFERMEDADES MONOGÉNICAS RECESIVAS: DEFICIENCIA DE ADENOSINA DEAMINASA Y PARAPLEJIA ESPÁSTICA HEREDITARIA TIPO 11

A. Gómez<sup>1</sup>; M. Dorado<sup>2</sup>; P. Sánchez<sup>2</sup>; E. Fernández<sup>1</sup>; M. Martínez-Fresno<sup>1</sup>  
 1Geniality Diagnóstico Genético, Madrid; 2Clínicas Ginemed, Sevilla  
[agomez@geniality.es](mailto:agomez@geniality.es)

### INTRODUCCIÓN

La Deficiencia de Adenosina Desaminasa (ADA) es una enfermedad genética grave con un modo de herencia autosómica recesivo, causada por mutaciones en el gen *ADA*, (20q13.12), conduce a una inmunodeficiencia combinada severa.

La Paraplejia Espástica Hereditaria (PEH) constituye un grupo de trastornos neurodegenerativos, caracterizados clínicamente por espasticidad y debilidad progresiva de los miembros inferiores. En concreto la PEH tipo 11 supone el 20% de las formas recesivas y se asocia con mutaciones en el gen *SPG11* (15q21.1).

Presentamos un caso de Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) combinado en una pareja, consanguínea tercer grado, con un niño fallecido diagnosticado como afecto de ADA. El marido refiere una hermana diagnosticada como afecta de PEH, tras el estudio de portadores realizado en

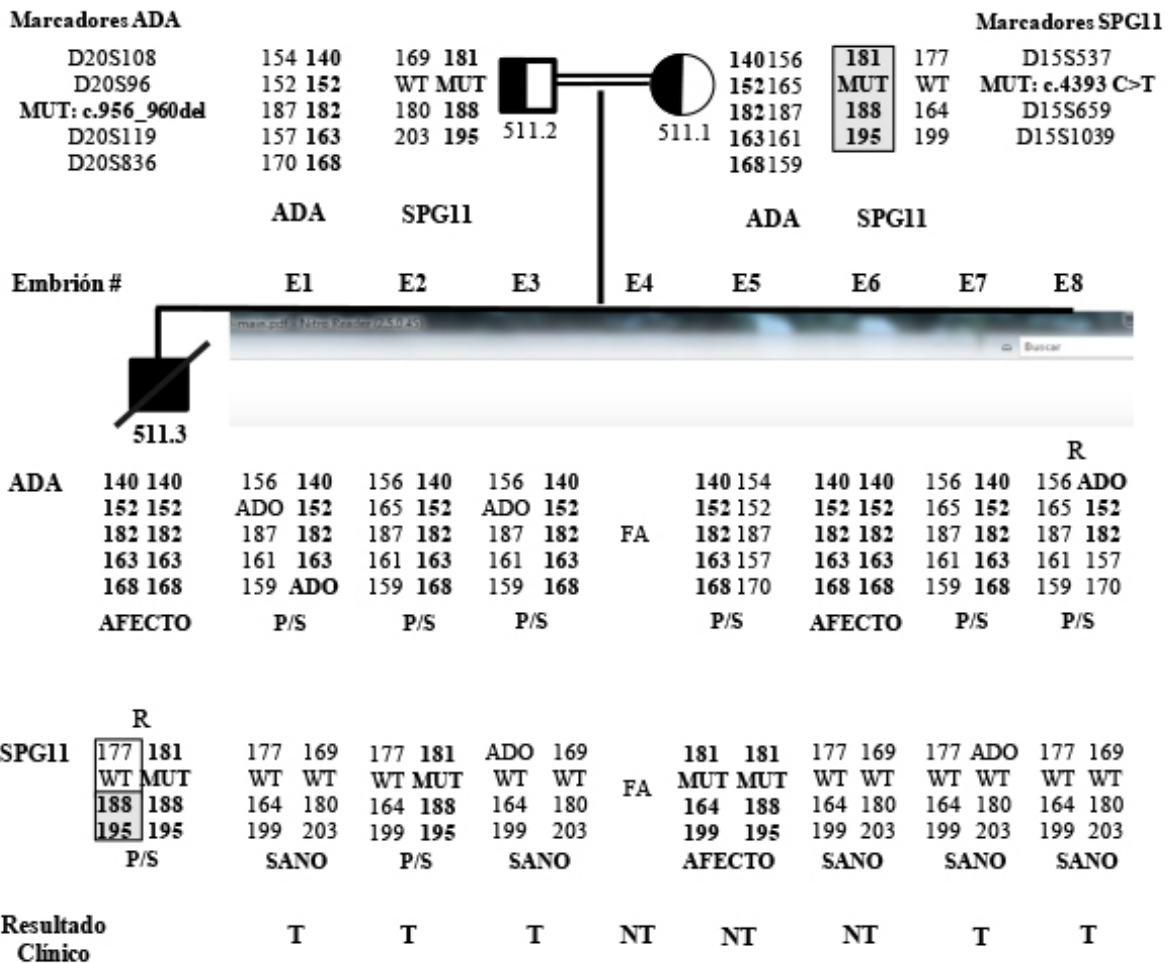


Figura 1. DGP combinado para ADA y SPG11. Mediante el análisis de haplotipos y mutaciones diagnosticamos los embriones sanos, afectados y portadores sanos (P/S) para cada una de las enfermedades. Además en el estudio de informatividad detectamos la recombinación (R) en el hijo fallecido (511.3) para SPG11 (recombinación sombreada en gris). En el DGP hubo un embrión recombinante (R) para ADA (E8) y un fallo de amplificación total (FA) de uno de los blastómeros (E4). Cinco embriones tuvieron resultado de transferibles (T) y tres no transferibles (NT).



nuestro laboratorio, se confirma que el varón es portador en heterocigosis de la misma mutación. Debido al grado de consanguinidad se decidió realizar estudio de portadores a la mujer con resultado positivo en heterocigosis.

### OBJETIVO

Desarrollo de un método de DGP basado en minisequenciación y análisis de fragmentos, para la detección de las dos enfermedades mediante el análisis de segregación de haplotipos y las mutaciones causantes de PEH (c.4393C>T) y ADA (c.956\_960delAAGAG).

### MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio de informatividad se realizó incluyendo muestras de la pareja, ambos portadores de ADA y PEH, ADN del hijo fallecido y la hermana del marido. Para el análisis del ADA se diseñaron marcadores tipo microsatélite que flanquean gen(D20S108, D20S96, D20S119 y D20S836) y primers específicos para la detección de la delección (c.956\_960delAAGAG). Para el análisis de PEH se diseñaron marcadores microsatélite que flanquean el locus *SPG11* (D15S641, D15S182, D15S537, D15S659 y D15S1039), así como primers específicos para la amplificación y posterior minisequenciación de la mutación c.4393C>T.

Se llevó a cabo el DGP en 8 blastómeros biopsiados en día+3 de 8 embriones. Tras la lisis alcalina, se llevó a cabo la amplificación mediante "Multiple Displacement Amplification" (Genomiphiv2), las PCRs Multiplex y reacción de minisequenciación usando los protocolos validados con anterioridad en el laboratorio.

### RESULTADOS

En el estudio de informatividad se identificaron un total de 4 y 3 marcadores semi-informativos para el ADA y el PEH respectivamente, además de 2 no informativos para PEH. Solo los marcadores semi-informativos se emplearon posteriormente en el DGP. En el caso del *SPG11*, el análisis de segregación nos permitió detectar la presencia de una recombinación en el

hijo fallecido en los haplotipos maternos (Figura 1).

Se obtuvo diagnóstico en 7 de los 8 blastómeros biopsiados. En el análisis de los STRs, la tasa media de ADO (allele drop out,) fue del 14,28% tanto para el ADA como el *SPG11*. La eficacia global de los marcadores fue del 100%. Ambas mutaciones tuvieron una tasa de amplificación del 100%. Se detectó un embrión recombinante sano para ADA. Se transfirieron 2 embriones, con resultado de embarazo evolutivo. Los demás embriones transferibles fueron congelados, con posibilidad de transferencia de un nuevo ciclo de FIV posterior.

### CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en este doble DGP nos indican la fiabilidad y robustez de la metodología empleada para el diagnóstico. No obstante, en los estudios de segregación se debe prestar especial atención a fenómenos como la recombinación. En esta pareja dado el grado de consanguinidad se pudo detectar este fenómeno previamente en el estudio de informatividad y confirmarlo en el DGP, pero hay que remarcar la importancia de usar un número adecuado de STRs y de familiares en el estudio de segregación con el fin de evitar errores diagnósticos.

## O-024: FIABILIDAD DEL DGP PARA LA DISTROFIA MUSCULAR FACIOESCAPULOHUMERAL POR EXCLUSIÓN DEL HAPLOTIPO DE RIESGO MEDIANTE STRS

C. Arjona; M. Sandalinas; E. Garcia-Guixé; A. Jiménez-Macedo; C. Giménez  
Reprogenetics, Barcelona  
[litus@reprogenetics.es](mailto:litus@reprogenetics.es)

### INTRODUCCIÓN

La distrofia muscular facioescapulohumeral (FSHD) es una enfermedad genética rara, de debut variable, aparición temprana (entre los 3 y los 50 años) y que afecta aproximadamente a 1/20000 individuos. Se caracteriza por una debilidad muscular (miopatía) de progresión lenta focalizada en los músculos de la cara, hombros y brazos.

La causa de la enfermedad se debe a la delección de la región repetitiva D4Z4 (situada en 4q35), en la que se localizan un grupo de genes (FRG1, ANT1 y DUX4) probablemente implicados en la aparición de la patología, y su herencia sigue un patrón autosómico dominante.

Debido al tipo de mutación causante de la patología (delección de gran tamaño), el diseño de protocolos de detección orientados al diagnóstico genético preimplantacional (DGP) de la patología se basa en la exclusión del haplotipo de riesgo mediante el uso de marcadores polimórficos del tipo STRs (short tandem repeats). Debido a que la región repetitiva D4Z4 se encuentra en una región telomérica, únicamente es posible localizar STRs upstream de 4q35, por lo que no es posible controlar posibles eventos de recombinación que puedan acarrear un error diagnóstico.

Para reducir al máximo el riesgo de diagnóstico erróneo por recombinación, es imprescindible trabajar con STRs cercanos a la región implicada para minimizar la posibilidad de recombinación.

### OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es validar el uso de STRs para la exclusión

del haplotipo de riesgo en el DGP de la FSHD y constatar que, aunque únicamente se trabaje con STRs situados a un lado del gen, si su distancia a dicho gen es pequeña y se determina que la región 4q35 no es una "región caliente" de recombinación, dichos STRs son un instrumento diagnóstico fiable.

### MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo recoge los resultados obtenidos por nuestro grupo en el DGP de la FSHD. Se han realizado 13 ciclos de FIV-DGP en los cuales se han analizado un total de 64 embriones.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tasa de embriones diagnosticados fue del 96,87%. De los 64 embriones analizados, 26 (40,6%) resultaron ser no delecionados pudiendo ser seleccionados para su transferencia. La tasa de embarazo fue del 30,8% y del 36,4% por ciclo y transferencia respectivamente.

Un total de 8 STRs (D4S2930, D4S1652, D4S2390, D4S2299, D4S426, D4S2921, D4S3051 y D4S171) fueron utilizados para el DGP indirecto de la patología mediante exclusión del haplotipo de riesgo. La distancia máxima entre el STR más lejano (D4S171) y el gen situado en la posición más telomérica (DUX4) es de 4,825Mb. La tasa media de amplificación de los 8 STRs fue del 86,2%, siendo el marcador D4S171 el que presenta una peor tasa de amplificación (48,78%). La tasa de allelic drop out (ADO) fue del 7,1% y la de contaminación del 4,1%.

En cuanto a la tasa de recombinación, únicamente se ha detectado 1 embrión que presentara un alelo discordante con el haplotipo esperado. Este alelo fruto de un proceso de recombinación se ha

dado en el marcador D4S171 que, por otro lado, es el que se encuentra a una distancia significativamente mayor que el resto de los marcadores utilizados.

### CONCLUSIÓN

La batería de STRs utilizados en nuestros protocolos, ofrece una buena tasa de amplificación y baja tasa de ADO (a excepción del marcador D4S171). Hemos podido constatar que la región 4q35 no corresponde con una "región caliente" de recombinación ya que únicamente hemos observado un único evento en el marcador D4S171 (5%) entre todos los embriones analizados.

El DGP para la FSHD mediante estudio de ligamiento es una herramienta fiable para aquellas parejas que quieran tener una descendencia libre de la patología sin tener que recurrir a la ILE.

**COMUNICACIONES PÓSTER**

# P-001: MARCADORES MORFOCINÉTICOS PREDICTIVOS EN LA FORMACIÓN DE BLASTOCISTOS DE BUENA CALIDAD

M. Asensio<sup>1</sup>; C. Castelló<sup>1</sup>; B. Freijomil<sup>1</sup>; J. Massó<sup>1</sup>; A. Farreras<sup>1</sup>; P. Fernández<sup>1</sup>; M. López-Teijón<sup>1,2</sup>; E. Velilla<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut Marquès, Barcelona, Barcelona. <sup>2</sup> Fundació Leonardo Marquès, Barcelona.

[marta.asensio@institutomarques.com](mailto:marta.asensio@institutomarques.com)

## INTRODUCCIÓN

Diversos estudios realizados han logrado establecer algunos marcadores morfocinéticos predictivos de buena calidad embrionaria y potencial implantatorio del embrión en día+3 (Messeguer et al. 2011) y en día+5 (Cruz et al. 2012; Wong et al. 2010).

## OBJETIVOS

Correlacionar la calidad morfológica de los embriones en día+5 con parámetros morfocinéticos como el tiempo de aparición y desaparición de pronúcleos, las horas de evolución hasta estadio de mórula y de expansión de los blastocistos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

243 ovocitos fecundados procedentes de 26 ciclos de donación de ovocitos fueron cultivados hasta día+5 en un incubador time-lapse (EmbryoScope®). Se valoró la calidad de los embriones a las 120h post-inseminación (Gardner & Schoolcraft

1999). Se definieron 4 grupos de calidad embrionaria en función del grado de expansión (exp.), la calidad de la masa celular interna (MCI) y del trofoectodermo (TFE), así como del potencial implantatorio (Van den Abbeel et al. 2012) siendo el grupo 1 el de mejor calidad.

- G1: exp. 5 o 4, con MCI y TFE-A/B
- G2: exp. 5 o 4 con MCI o TFE-C, exp. 3 con MCI y TFE-A/B y exp. 3 con MCI o TFE-C.
- G3: exp 3 y 4 con MCI y TFE-C, exp 2 y 1
- G4: Embriones que a las 120h no han alcanzado el estadio de blastocisto inicial.

Se determinó el tiempo en el que aparecen ( $T_{PN}$ ) y desaparecen los pronúcleos ( $T_{DPN}$ ), el tiempo en llegar a mórula ( $T_M$ ) y a blastocisto expandido ( $T_{BE}$ ). Análisis estadístico: test de  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS

Las tablas muestran los parámetros morfocinéticos evaluados en función de

la calidad de los embriones a las 120h de cultivo embrionario.

El grupo de embriones de mejor calidad para transferir (G1 y G2) presenta: un  $T_{DPN}$  estadísticamente inferior a las 24h ( $P=0.0005$ ), un  $T_M$  significativamente inferior a las 90h ( $P=0.0001$ ), y un  $T_{BE}$  significativamente inferior a las 110h de evolución ( $P=0.001$ ) respecto a los embriones de peor calidad. No existe correlación significativa entre  $T_{PN}$  y la calidad de los blastocistos.

## CONCLUSIONES

Existe una correlación estadísticamente significativa entre la calidad de los blastocistos y el tiempo de desaparición de pronúcleos, el tiempo en que llegan a estadio de mórula y el tiempo en que llegan a blastocisto expandido. Un  $T_{DPN}$  inferior a 24h, un  $T_M$  inferior a las 90h y un  $T_{BE}$  inferior a las 110h, son parámetros a tener en cuenta a la hora de seleccionar los mejores embriones para transferir en día+5.

**Tabla 2** -  $T_M$  y  $T_{BE}$  en función de la calidad embrionaria en día+5.

	$T_M$ :horas (n=176)			$T_{BE}$ :horas (n=114)		
	<90h (%)	90-100h (%)	>100 (%)	<110h (%)	110-115h (%)	>115h (%)
<b>G1</b>	22(68.8%)	10(31.2%)	0(0%)	19(59.4%)	12(37.5%)	1(3.1%)
<b>G2</b>	12(25.5%)	27(57.5%)	8(17%)	8(17%)	17(36.2%)	22(46.8%)
<b>G3</b>	10(16.4%)	24(39.3%)	27(44.3%)	2(6.4%)	7(22.6%)	22(71%)
<b>G4</b>	6(16.7%)	8(22.2%)	22(61.1%)	0(0%)	0(%)	4(100%)

**Tabla 1.**  $T_{PN}$  y  $T_{DPN}$  en función de la calidad embrionaria en día+5.

	$T_{PN}$ :horas (n=243)			$T_{DPN}$ :horas (n=243)			
	<7h (%)	7-8h (%)	>8h (%)	<22h(%)	22-24h (%)	>24-26h (%)	>26 (%)
<b>G1</b>	18(56.3%)	8(25%)	6(18.7%)	15(46.9%)	11(34.4%)	5(15.6%)	1(3.12%)
<b>G2</b>	21(44.7%)	16(34%)	10(21.3%)	13(27.7%)	19(40.4%)	8(17%)	7(14.9%)
<b>G3</b>	30(49.1%)	17(27.9%)	14(23%)	21(34.4%)	13(21.3%)	12(19.7%)	15(24.6%)
<b>G4</b>	38(36.9%)	29(28.1%)	36(56.2%)	27(26.2%)	21(20.4%)	20(19.4%)	35(34%)



## P-002: DISMINUCIÓN DE LOS EMBARAZOS MÚLTIPLES MEDIANTE eSET Y VITRIFICACIÓN DE EMBRIONES

M. Morales; L. Andrés; M. Sánchez; E. Ricciarelli; E. Hernández; J. Cuadros  
Centro de Medicina de la Reproducción y Ginecología FivMadrid, Madrid  
[jcuadros@fivmadrid.es](mailto:jcuadros@fivmadrid.es)

### INTRODUCCIÓN

Disminuir la tasa de embarazos múltiples es uno de los objetivos prioritarios en los centros de reproducción asistida. Se ha sugerido que una de las alternativas para alcanzar este objetivo sería la transferencia de un único embrión (eSET) en los casos de buen pronóstico. Además, teniendo en cuenta que en estos ciclos de buen pronóstico probablemente se congelarían embriones, la acumulación de los embarazos en fresco más los embarazos en una descongelación posterior podrían igualar la probabilidad de embarazo de los ciclos en los que se transfieren dos embriones en fresco (DET), eliminando casi por completo los embarazos gemelares.

### OBJETIVOS

En este estudio retrospectivo se pretende comparar la tasa de embarazo

clínico, la tasa de embarazo acumulada con la descongelación, y la tasa de embarazo gemelar entre los ciclos con transferencia electiva de un embrión vs los ciclos con transferencia de dos embriones.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se compararon ciclos con transferencia y vitrificación de embriones de pacientes con oocitos propios hasta 37 años inclusive (28 ciclos de eSET vs 269 de DET). El análisis estadístico se realizó mediante Chi-cuadrado.

### RESULTADOS

Las tasas de embarazos clínicos en los ciclos de eSET y en los de DET fueron de 32,1% (9/28) y 57,6% (155/269), respectivamente; las tasas de embarazos gemelares fueron de 0 y

34,8% (54/155), respectivamente y las tasas de embarazos clínicos acumuladas con la descongelación fueron de 57,1% (16/28) y 69,5% (187/269), respectivamente. La tasa de embarazos clínicos es estadísticamente mayor en la DET ( $p < 0,01$ ), pero esta diferencia ya no se observa en las tasas de embarazos acumuladas con la descongelación.

### CONCLUSIONES

Aunque con la DET se obtienen estadísticamente más embarazos que con la eSET en las transferencias en fresco, las tasas de embarazos acumuladas con los ciclos de descongelación de embriones no son diferentes. Por otro lado, con la eSET se evitan los embarazos gemelares, que en la DET son casi del 35%.

## P-003: ACOTANDO PUNTOS DE ROTURA EN UNA SOLA CÉLULA MEDIANTE ARRAY-CGH 24SURE+ EN TRASLOCACIONES RECÍPROCAS

E. Fernández; A. Gómez; P. Eibes; M. Martínez-Fresno  
Geniality Diagnóstico Genético, Madrid  
[efgarcia@geniality.es](mailto:efgarcia@geniality.es)

### INTRODUCCIÓN

Las traslocaciones cromosómicas son alteraciones en las que todo o parte del cromosoma se une o se intercambia con otro cromosoma entero o con un segmento del mismo. Las traslocaciones recíprocas pueden involucrar cualquier cromosoma e implican la rotura de dos de estos con intercambio de fragmentos y representan uno de los reordenamientos más comunes en la población (1/673). Los pacientes portadores de estas alteraciones estructurales en equilibrio,

no presentan ninguna manifestación clínica, pero sí podrán generar gametos con desequilibrios cromosómicos que darán lugar a embriones alterados produciendo fallos de implantación, abortos espontáneos o niños con anomalías congénitas. La detección de estas traslocaciones se realiza mediante cariotipo convencional, que no permite establecer el punto molecular de rotura exacto. La introducción del array-CGH (aCGH) en el Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) nos permite el diagnóstico de los

embriones desequilibrados y el análisis de aneuploidías en los 23 pares de cromosomas, así como establecer a nivel molecular el punto de rotura exacto de la traslocación.

### OBJETIVOS

Acotar, establecer los puntos de rotura en una sola célula mediante el análisis de los perfiles de array-CGH de embriones desequilibrados en DGP y comparar los puntos de corte de las traslocaciones en los progenitores.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los pacientes incluidos en el estudio pasaron consulta de consejo genético donde se evaluó el resultado del cariotipo convencional que presentaban y se les asesoró de las distintas posibilidades y ventajas que ofrece el aCGH en el DGP. Se incluyeron 16 ciclos de DGP de 12 parejas con traslocaciones recíprocas (biopsia de 1 célula en día+3) en los que se analizaron un total de 101 embriones mediante protocolo para aCGH 24sure+. Se detectaron 52 embriones desequilibrados, cuyas imágenes y puntos de rotura, fueron analizados con el software BlueFuse (BlueGnome, Cambridge UK). El ratio para considerar el número de copias como normales se estableció entre +0.3 y -0.3 (valores por encima de estos se consideran ganancias y por debajo pérdidas). Como referencia del punto de rotura se seleccionó la primera sonda que presentaba el desequilibrio (superior o inferior al ratio establecido). Esa sonda

nos indicó la posición exacta (en pares de bases) y el inicio de la traslocación.

## RESULTADOS

En todos los blastómeros desequilibrados para la traslocación recíproca, los puntos de rotura fueron diferentes a los obtenidos mediante cariotipo convencional en los progenitores (Tabla I). Detectamos la posición donde se produce la rotura en cada uno de los cromosomas implicados (Figura 1), pudiendo calcular el tamaño del fragmento traslocado en cada uno de los casos (Tabla I). Se analizaron todos los embriones desequilibrados con una misma indicación y se comprobó que estos no difieren entre en más de  $\pm 3$  sondas BAC, incluidas todas ellas en la misma banda citogenética

## CONCLUSIONES

El aCGH 24sure+ aplicado al DGP presenta una gran resolución diagnóstica, permitiendo incluso la detección

de puntos de rotura cromosómicos analizando el ADN de una sola célula. El DGP de traslocaciones mediante aCGH, nos ha permitido delimitar los puntos de rotura estableciendo con mayor exactitud y fiabilidad el tamaño de los fragmentos intercambiados, frente al resultado mediante cariotipo convencional, ofreciendo de este modo un dato adicional a los pacientes. La importancia de acotar los puntos de rotura no solo radica en la posibilidad de detección de estas anomalías en células embrionarias, sino también, que estos puntos de corte pueden estar localizados en regiones del genoma donde se localice algún gen con una función específica provocando un fenotipo anormal (genes relacionados con algún tipo de cáncer). Además del análisis del desequilibrio, se detectan aneuploidías en los 23 pares de cromosomas.

# P-004: ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS DE LOS GAMETOS MASCULINOS EN HOMBRES CON CARIOTIPO NORMAL COMO POSIBLE CAUSA DE ABORTO ESPONTÁNEO

O. López Rodrigo<sup>1</sup>, O. Martínez-Pasarell<sup>1</sup>, A. García<sup>1</sup>, A. Mata<sup>1</sup>, E. García-Guixó<sup>2</sup>, J. Sarquella<sup>4</sup>, A. Jiménez-Macedo<sup>2</sup>, A. Polo<sup>3</sup>, P. Viscasillas<sup>3</sup>, Ll. Bassas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Lab Seminología y Embriología Fundació Puigvert;

<sup>2</sup> Reprogenetics;

<sup>3</sup> Servicio de Ginecología Hospital de la Santa Creu y Sant Pau;

<sup>4</sup> Servicio de Andrología Fundació Puigvert. Barcelona.

[olopez@fundacio-puigvert.es](mailto:olopez@fundacio-puigvert.es)

## INTRODUCCIÓN

La producción de espermatozoides aneuploides durante la espermatogénesis puede dar lugar al incremento de embriones cromosómicamente anormales. Esta patogenia puede explicar, en algunas parejas infértiles, el origen de los abortos espontáneos.

## OBJETIVOS

Estudiar los parámetros seminales y

la composición cromosómica de los espermatozoides en hombres infértiles con cariotipo normal, cuyas parejas presentan abortos espontáneos no explicados. Describir el beneficio del cribado genético preimplantacional (PGS) en tales casos, en el contexto de un programa asistencial público.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizó retrospectivamente una población de 204 hombres atendidos durante el periodo del 2000-2013 por

esterilidad o infertilidad. Entre ellos se seleccionaron 98 individuos (48,0%) cuyas parejas habían sufrido al menos un aborto espontáneo (rango: 1-7) y con estudio ginecológico aparentemente normal. Ambos miembros de la pareja aportaban un cariotipo normal. Se analizaron los parámetros clínicos (edad de la mujer), reproductivos (número de pérdidas gestacionales previas) y seminales (concentración, motilidad y morfología). Se realizó un estudio de aneuploidías espermáticas mediante FISH en espermatozoides

con 5 sondas (cromosomas 13, 18, 21, X e Y), cuyos resultados se expresaron cualitativamente (FISH normal o alterada) y cuantitativamente (porcentaje de gametos aneuploides).

Se evaluaron también los resultados reproductivos al realizar PGS (20 ciclos) en 12 parejas (cariotipo normal) con abortos espontáneos y alteraciones en el estudio de la meiosis y/o resultado de FISH en espermatozoides alterado. La biopsia embrionaria se realizó en D+3 (6-8 células) y el análisis citogenético se realizó por FISH para 7 y 9 cromosomas o por CGH. Se evaluaron los parámetros analizados clínicos, embriológicos y reproductivos. Para el análisis estadístico se aplicaron las pruebas de Chi-cuadrado y T-test, considerando valores significativos cuando  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

Se encontró un resultado cualitativamente alterado de la FISH (FISH-A) en 23/98 pacientes (23,5%), donde el valor medio para

las disomías XY, 13, 21 y diploidías fue de 1,06%, 0,64%, 0,62% y 0,88% respectivamente. Globalmente no se hallaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros clínicos o seminológicos entre los pacientes con FISH normal (FISH-N) o FISH-A.

De las parejas con  $< 3$  abortos ( $n=33$ ) un 27,3% mostraron FISH-A y la edad de la mujer fue  $33,7 \pm 2,6$  años (media  $\pm$  DE) en pacientes con FISH-N, y  $35,6 \pm 5,6$  años con FISH-A ( $p < 0,01$ ).

En el grupo con  $\geq 3$  abortos ( $n=65$ ), el 21,5% mostraron FISH-A no presentando diferencias significativas con el grupo  $< 3$  abortos.

De los 20 ciclos de PGS iniciados, el 65% (13/20) llegaron a transferencia ( $2,1 \pm 0,8$  embriones transferidos). La tasa de gestación por transferencia fue del 53,8%, con una edad materna de  $34,6 \pm 3,6$  años. Las mujeres que consiguieron gestación tuvieron un menor número de embriones aneuploides ( $4,1 \pm 2,3$ ) que las no gestantes ( $6,5 \pm 4,3$ ;  $p < 0,01$ ).

## CONCLUSIONES

1) En parejas infértiles con abortos recurrentes, la proporción de hombres con incremento de aneuploidías espermáticas es del 23,5%, mayor que la descrita en la población general de hombres infértiles con cariotipo normal (14%)\*.

2) Además, el porcentaje total de anomalías cromosómicas en los espermatozoides (disomías XY, 13, 21 y diploidías) de esta población es superior al observado en los registros globales de hombres infértiles\*.

3) Sin embargo, un mayor número de abortos no se asocia con mayor número de alteraciones en los cromosomas espermáticos.

4) Nuestra modesta casuística de tratamiento con PGS sugiere buenos resultados reproductivos y una reducción de nuevas pérdidas gestacionales.

\*Sarrate Z, Vidal F, Blanco J. *Fertil Steril*. 2010; 93:1892-902

## P-005: T8 Y S3: ¿NUEVOS MARCADORES MORFOCINÉTICOS EN LA FORMACIÓN DE BLASTOCISTO?

O. Ruiz; A. Múgica; A. Serra; A. Calderón; M. Belmonte; M. Torres; J. Marqueta  
Instituto Balear de Infertilidad IBILAB, Palma de Mallorca, Baleares. Palma de Mallorca  
[oruiz@ibilab.es](mailto:oruiz@ibilab.es)

### INTRODUCCIÓN

La transferencia en D+5 ofrece mejores tasas de implantación debido a que se produce una selección natural del embrión y el endometrio se encuentra en condiciones más fisiológicas.

Sin embargo, no todos los embriones son capaces de alcanzar el estadio de blastocisto.

### OBJETIVOS

Determinar los mejores marcadores morfocinéticos que permitan mejorar la predicción del desarrollo embrionario a

estadio de Blastocisto.

Construir un algoritmo que clasifique los embriones según su probabilidad de formación de blastocisto.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo de 33 ciclos de ovodonación realizados entre 2012 y 2013, en los cuales se analizaron 268 embriones y su clasificación se realizó siguiendo parámetros ASEBIR. Todos los embriones fueron incubados en el EmbryoScope® (ES) (Unisense FertiTech, Denmark) y las transferencias se realizaron en D+5.

Del total de embriones, 141 formaron un blastocisto de buena calidad (grupo A), y 127 fueron descartados (grupo B).

Las variables morfocinéticas estudiadas fueron t2 (tiempo de división a 2 células), t5 (tiempo de división a 5 células), t8 (tiempo de división a 8 células) y s3 (sincronía del tercer ciclo celular, t8-t5). Para definir las variables que mejor discriminaban entre formación de blastocisto de buena calidad o no, realizamos un análisis estadístico mediante curvas ROC.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS 15.0

## RESULTADOS

Los valores más altos de AUC para las 4 variables estudiadas (Tabla 1) se obtienen para t8 y s3, por lo que son las seleccionadas para definir un algoritmo que pueda predecir la formación de blastocisto.

Variables	AUC	IC (95%)
t2	0,64	(0,565 - 0,715)
t5	0,567	(0,486 - 0,649)
t8	0,708	(0,635 - 0,781)
s3	0,678	(0,603 - 0,752)

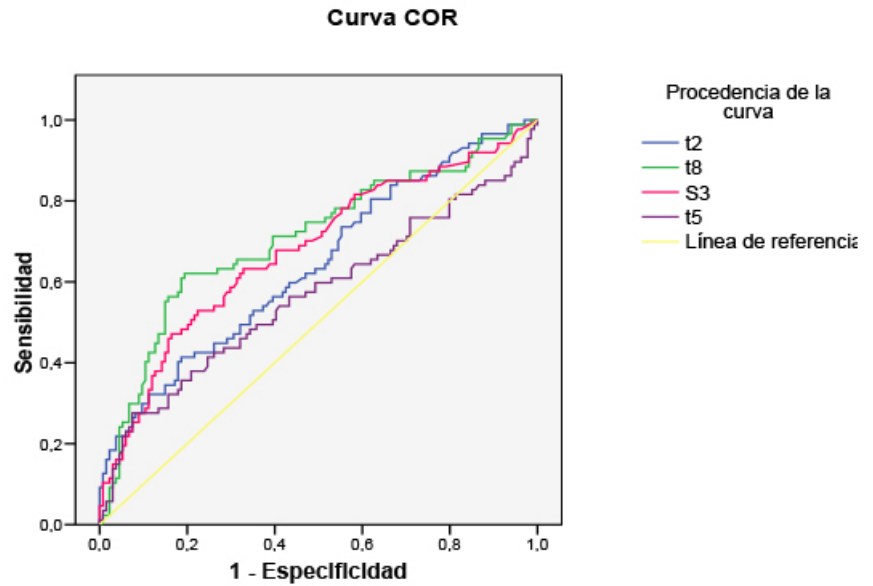
Tabla 1

Los valores cut-off obtenido en la curva ROC que mejor discrimina entre ambos grupo para estas dos variables son:

- t8: 60,22 (62% Sensibilidad y 82% Especificidad)
- s3: 6,34 (63% Sensibilidad y 67% Especificidad)

En la Tabla 2 se especifica la probabilidad de formación de blastocistode buena calidad para cada una de las variables por separado, en función de si están por debajo o por encima del valor establecido.

En función de estos resultados definimos un algoritmo que categorice a los embriones según su probabilidad de formar un blastocisto de buena calidad, siendo t8 la variable con más peso en dicho algoritmo.



	Grupo A	Grupo B	
t8 ≤ 60,22	107 (76%)	33 (24%)	$\chi^2 < 0,005$
> 60,22	27 (33%)	54 (67%)	
s3 ≤ 6,34	90 (73%)	33 (27%)	$\chi^2 < 0,005$
> 6,34	44 (45%)	54 (55%)	

Tabla 2

En la Tabla 3 se puede observar el número de blastos que se forman en cada uno de los grupos, observándose diferencias estadísticamente significativas entre las categorías.

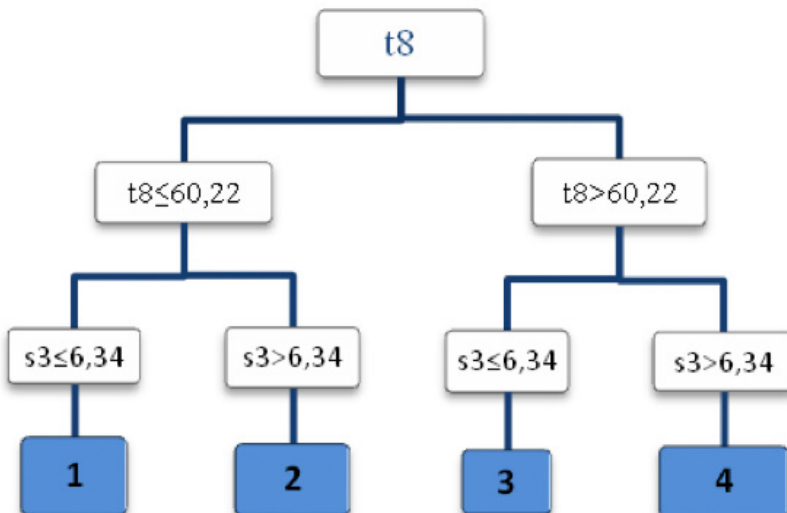
La discrepancia de los resultados en la categoría 3 podría explicarse por la baja n en este grupo.

## CONCLUSIONES

En nuestro estudio, el tiempo de división a 8 células y la sincronía del tercer ciclo celular son las variables que mejor pueden predecir la capacidad de un embrión de llegar a estadio de blastocisto.

El algoritmo definido con la combinación de estas dos variables permite mejorar en casi un 30% la capacidad de predicción de formación de blastocisto.

Son necesarios estudios posteriores que puedan relacionar estas variables con tasa de implantación y poder seleccionar el embrión más viable sin necesidad de esperar hasta D+5.



Grupos	A	B
1	82 (79%)	22 (21%)
2	20 (67%)	10 (33%)
3	4 (28%)	10 (71%)
4	28 (38%)	45 (62%)

Tabla 3  $\chi^2 < 0,001$



## P-006: ACREDITACIÓN DEL LABORATORIO DE DGP: IMPLEMENTACIÓN DE LA NORMA ISO 15189 POR PRIMERA VEZ EN ESPAÑA

X. Vendrell, T. Alberola, M. Pardo, R. Bautista-Llácer, E. García-Mengual, C. Sánchez-Matamoros, E. Raga.  
Sistemas Genómicos, Unidad de Genética Reproductiva, Parque Tecnológico de Valencia, Ronda G. Marconi 6, 46980 Paterna (Valencia).  
[javier.vendrell@sistemasgenomicos.com](mailto:javier.vendrell@sistemasgenomicos.com)

### INTRODUCCIÓN

Los laboratorios de análisis genéticos ofrecen una información médica vital en momentos clave del proceso asistencial. Los resultados de los estudios genéticos son únicos y, en la gran mayoría de los casos, se realizan una sola vez en la vida. En el campo del DGP, el análisis genético de los embriones tiene una implicación adicional ya que afecta a la pareja y a la descendencia futura. Además, desde el punto de vista técnico tiene la dificultad añadida de trabajar con una sola célula. En este contexto, el aseguramiento de la calidad es radicalmente importante. A nivel internacional, la norma ISO 15189 es el principal estándar para la acreditación de los laboratorios médicos. La "acreditación" representa el nivel más alto de calidad porque introduce el concepto de "competencia técnica", a diferencia de normas de gestión de la calidad como la certificación ISO 9001.

### OBJETIVOS

Presentar el proceso completo para alcanzar la acreditación de un laboratorio de DGP de acuerdo con la norma ISO 15189:2007.

### MATERIAL Y MÉTODOS

La implementación de la norma requiere el establecimiento de controles estrictos a dos niveles: gestión y requerimientos técnicos. Desde el punto de vista de gestión se estableció un flujo documental (registros de ensayos, instrucciones técnicas, manuales, etc), identificación de no conformidades, acciones preventivas y correctivas, auditorías internas, compromiso de la Dirección, evaluación de proveedores y planes de contingencia. En el capítulo de los requerimientos técnicos, es requisito de la norma tener establecido un sistema de control de calidad interno

y uno externo. Esto obliga a participar en rondas de comparación interlaboratorio y contar con material de referencia testado. Además, la verificación de los equipos resulta decisiva. Para ello, se estableció un exhaustivo programa de calibración y mantenimiento preventivo. Finalmente, la validación y verificación del método diagnóstico es el punto crítico de la implementación. Para controlarlo se estableció un procedimiento especial que asegura la repetibilidad (intra/inter técnico e intra/inter equipamiento) en diferentes momentos. Se realizaron 1503 reacciones de PCR en célula única, con 10 series de oligonucleótidos específicos para marcadores microsatélite de los genes *HTT*, *DMPK* y *FMR1*. Los amplicones se secuenciaron automáticamente y se analizaron mediante electroforesis capilar. En todos los casos se introdujeron controles heterocigotos para los microsatélites utilizados. En cada caso se determinó la precisión (intra/inter laboratorio e intra/inter operario), la veracidad, la exactitud y el límite de detección. Finalmente, se estudió la tasa de concordancia de los valores de repetibilidad en relación con el porcentaje de ADO (*allele drop out*), tasa de amplificación y amplificación preferencial. Los niveles de significación estadística se establecieron mediante el test de la *t* de Student con un intervalo de confianza de  $\alpha=0,05$ .

### RESULTADOS

el análisis de los electroferogramas mostró niveles de concordancia del 100% con distintos equipos, distintos operarios y en días diferentes. La tasa de ADO se estableció por debajo del 10% y la tasa de amplificación fue >90 %.

### CONCLUSIONES

La acreditación en el campo del DGP ha sido comunicada por muy pocos

laboratorios en el mundo (sólo tres registros, fuente: *ESHRE PGD Consortium website*). La competencia técnica del laboratorio de DGP conforme a la norma ISO 15189 permite establecer un sistema robusto, reproducible, veraz y exacto, de forma que identificamos la mínima desviación de manera inmediata, aumentando al máximo la calidad del análisis genético en una sola célula embrionaria.

## P-007: MORFOCINETICA DIFERENCIAL ENTRE EMBRIONES EUPLOIDES Y ANEUPLOIDES

C. Morales<sup>1</sup>; S. Fernández<sup>1</sup>; A. Colomar<sup>1</sup>; M. Valiente<sup>1</sup>; E. Toro<sup>1</sup>; R. Garcia<sup>1</sup>; S. Modamio<sup>1</sup>; M. López-Tejón<sup>2,3</sup>; E. Velilla<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Medicina Embrionaria, Barcelona, Barcelona.

<sup>2</sup> Institut Marquès, Barcelona, Barcelona.

<sup>3</sup> Fundación Leonardo Marques, Barcelona, Barcelona

[silviafernandez@pgdcem.com](mailto:silviafernandez@pgdcem.com)

### INTRODUCCIÓN

La tecnología time-lapse permite monitorizar el desarrollo embrionario de forma continuada y no-invasiva, obteniendo así información de la morfocinética de cada embrión lo que ha permitido establecer nuevos marcadores de viabilidad embrionaria. Existen pocos trabajos que correlacionen los parámetros morfocinéticos con la euploidía y aneuploidía embrionaria en busca de marcadores no invasivos (Campbell et al., 2013; Cetinkaya et al., 2013; Mazur et al., 2013).

### OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es determinar si existe algún parámetro no invasivo que permita establecer criterios predictivos de la dotación cromosómica del embrión y así una mejor selección de los mismos antes de su transferencia, en aquellos casos donde no se realice DGP.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizan retrospectivamente 571 embriones de 151 ciclos de FIV con indicación de Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP). Se realiza DGP en día+3 mediante FISH-24 cromosomas y cultivo embrionario con medios Vitrolife en un incubador time-lapse (EmbryoScopeTM). Mediante el sistema Embryo@Viewer se evalúa los tiempos en que el embrión inicia compactación (TC), alcanza el estadio de mórula (TM), de blastocisto incipiente (TB) y de blastocisto expandido (TBE) hasta las 120h post-ICSI. Se establecen diferentes categorías de tiempos para cada parámetro estudiado: TC (<80h, 80-100h y >100h), TM (<90h, 90-100h y >100h), TB (<100h, 100-110h y >110h) y TBE (<110h, 110-115h y >115h). Se

analizan estadísticamente los tiempos de evolución con los resultados de euploidía / aneuploidía mediante un test de Chi-cuadrado con un intervalo de confianza de 0,05.

### RESULTADOS

En un 89,1% de los embriones se pudo valorar TC (509/571). De estos, un 35% (178/509) son normales y un 65% (331/509) alterados. No se obtuvo una correlación estadísticamente significativa entre la dotación cromosómica y los TC ( $p=0,483$ ).

En un 77,2% de los embriones analizados se pudo valorar TM (441/571). De éstos, un 41,5% son normales (183/441) y 58,5% son alterados (258/441). Existe una correlación estadísticamente significativa entre la dotación cromosómica y el TM ( $p=0,028$ ): por debajo de las 90h de TM existe una proporción de embriones euploides superior a la de alterados. Esta proporción se invierte en el grupo de embriones que llegan a mórula por encima de las 90h, encontrando una proporción más elevada de embriones cromosómicamente alterados. A pesar de esto, no existe una correlación entre el tipo de anomalía cromosómica que tiene el embrión (aneuploidía pura, aneuploidía doble, cromosomopatías múltiples y haploide/poliploide) y el TM ( $p=0,639$ ).

En un 60,7% de los embriones se pudo valorar TB (347/571). De éstos, un 46,1% son normales (160/347) y 53,9% son alterados (187/347). En un 25,9% de los embriones analizados se pudo valorar TBE (148/571). De éstos, un 56,1% son normales (83/148) y 43,9% son alterados (65/148). No existe una correlación estadísticamente significativa entre la

dotación cromosómica y los tiempos de blastocisto (TB y TBE;  $p=0,1353$  vs  $p=0,330$  respectivamente).

### CONCLUSIÓN

Existe una correlación estadísticamente significativa entre la dotación cromosómica y el TM, observándose un aumento de la proporción de embriones con anomalías cromosómicas en el grupo de embriones que llegan a estadio de mórula por encima de las 90h.

El tiempo de mórula puede ser un buen parámetro a tener en cuenta en el momento de seleccionar los mejores embriones para transferir en ciclos de riesgo cromosómico que no se realiza DGP.

### BIBLIOGRAFÍA

Campbell, A et al. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non invasive morphokinetics. 2013. *Reproductive BioMedicine Online* 26(5):477-85.

Cetinkaya M, et al. Comparative evaluation of aneuploid and euploid embryos using time-lapse. 2013. 12<sup>th</sup> International Conference on Preimplantation Genetic Diagnosis. *Reproductive BioMedicine Online*, 26 suppl 1:S18.

Mazur P, et al. Time-lapse investigation of embryos with different types of aneuploidy. 2013. 12<sup>th</sup> International Conference on Preimplantation Genetic Diagnosis. *Reproductive BioMedicine Online*, 26 suppl 1:S18.

## P-008: TASA DE SUPERVIVENCIA DE BLASTOCISTOS TRAS BIOPSIA DE TROFOECTODERMO Y POSTERIOR VITRIFICACIÓN

P. Valero, L. Garrido, J. Serna, E. Gil, R. Herrer  
IVI Zaragoza, Zaragoza, Aragón.  
[pilar.valero@ivi.es](mailto:pilar.valero@ivi.es)

### INTRODUCCIÓN

El Diagnóstico Genético Preimplantacional para screening de aneuploidias (DGP-S) consiste comúnmente en la extracción de una célula del embrión en D+3 de desarrollo, y posterior transferencia en estadio de blastocisto. En los últimos años ha cobrado fuerza la biopsia de trofoectodermo, que conlleva la vitrificación de los blastocistos biopsiados a la espera de los resultados genéticos y la posterior transferencia en diferido.

Las técnicas de vitrificación son altamente efectivas y han supuesto una revolución en cuanto a la criopreservación de blastocistos, alcanzando tasas de supervivencia cercanas al 100%.

### OBJETIVOS

Evaluar la tasa de supervivencia de los procesos de vitrificación/desvitrificación de blastocistos en los que se ha realizado biopsia de trofoectodermo,

### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo de 46 blastocistos biopsiados y vitrificados procedentes de ovocitos propios. Los embriones se cultivaron en GLOBAL (LifeGlobal), a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y bajas concentraciones de Oxígeno.

Al menos 1 hora después de la biopsia se vitrificaron los blastocistos utilizando la técnica de Cryotop® (Kitazato) según protocolo.

Las células de trofoectodermo fueron analizadas para los 24 cromosomas por Arrays de CGH. Los embriones genéticamente normales fueron

desvitrificados y transferidos y los embriones genéticamente anormales descartados.

Se compararon los resultados con dos grupos control: por un lado transferencias de blastocistos vitrificados de pacientes de ovocitos propios (Grupo C1) y por otro transferencias de blastocistos vitrificados procedentes de pacientes a los que se realizó biopsia embrionaria en D+3 de desarrollo y que tras la transferencia en fresco tuvieron blastocistos sobrantes (Grupo C2).

### RESULTADOS

De los 46 blastocistos analizados, 21 fueron diagnosticados como normales (45.7%) y 25 como anormales (55.3%).

La tasa de supervivencia se evaluó de la siguiente forma:

- 100% Supervivencia: 43 blastocistos (94%)
- Supervivencia Parcial (presentan una zona dañada): 2 blastocistos (4%)
- 0% Supervivencia: 1 blastocisto (2%).

Tasa general de supervivencia: 98%.

No se encontraron diferencias significativas cuando se compararon los resultados con los grupos C1 (98%, n= 1/75) y C2 (100%, n=12).

Teniendo en cuenta la calidad morfológica, 24 de los blastocistos fueron clasificados como A+B (52.7%) y 22 como C (47.8%) (ASEBIR), no existiendo diferencias significativas en cuanto a supervivencia entre ambos grupos.

### CONCLUSIONES

La tasa de supervivencia de los blastocistos a los que se les realiza biopsia de trofoectodermo es perfectamente comparable a las generales de la clínica y a las de supervivencia de embriones biopsiados en D+3 y vitrificados en D+5/D+6. Se puede decir por tanto que el hecho de tener que vitrificar los blastocistos y transferir en diferido no perjudica las posibilidades del ciclo.

Por otro lado, no se encuentran diferencias en cuanto a supervivencia en función de calidad embrionaria. Esto se puede explicar porque un elevado porcentaje de blastocistos clasificados según ASEBIR como tipo C son blastocistos que presentan una buena morfología, pero su grado de expansión no es el adecuado.

## P-009: BINUCLEACIÓN VERSUS MULTINUCLEACIÓN EN ESTADÍO DE 2 CÉLULAS, ¿CÓMO AFECTA A LA TASA DE IMPLANTACIÓN?

M. Ojeda, E. Táboas, M. Pérez, D. Kassa, E. Muñoz, J. Aguilar  
IVI Vigo, Vigo, Pontevedra  
[maria.ojeda@ivi.es](mailto:maria.ojeda@ivi.es)

### INTRODUCCIÓN

Las alteraciones en la nucleación de las blastómeras embrionarias (más de un núcleo por célula) son relativamente frecuentes en los embriones de fecundación *in vitro* y pueden deberse a errores en la citocinesis, fragmentación nuclear o errores en el empaquetamiento del ADN. Su caracterización se recomienda en embriones de 4 células (Istanbul Consensus, 2012) y está asociada a bajo potencial de implantación. No obstante, hay embriones de 2 células con estos errores, que en estadio de 4 células presentan sólo un núcleo por célula.

### OBJETIVO

Evaluar la incidencia de los errores de nucleación en blastómeras durante el segundo ciclo celular y su posible influencia en la tasa de implantación según sea binucleación (2 núcleos por blastómera) o multinucleación (3 o más núcleos por blastómera).

### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo de 475 embriones transferidos procedentes de 2697 ovocitos microinyectados de 420 pacientes sometidas a tratamientos de ICSI desde Enero del 2011 hasta Noviembre del 2012. Los embriones fueron cultivados en un incubador con tecnología time lapse.

Únicamente embriones con un núcleo por blastómera en 4 células y con implantación conocida (KID) fueron incluidos en el estudio, considerándose embriones KID+ aquellos donde el número de sacos gestacionales coincide con el número de embriones transferidos en un mismo tratamiento y KID- aquellos donde no hubo

implantación.

Clasificamos los datos en 6 categorías según la implantación (KID+, KID-) y el número de blastómeras con errores de nucleación (grupo 0 = ninguna blastómera, grupo 1 = 1 blastómera, grupo 2 = 2 blastómeras). Cada blastómera con error de nucleación se clasificó a su vez como binucleada (2 núcleos por célula) o multinucleada (3 o más núcleos por célula).

La transferencia embrionaria se realizó en día 2-3 de desarrollo. Se confirmó la implantación embrionaria mediante ecografía, detectando la presencia de sacos gestacionales.

El estudio estadístico se realizó mediante test  $\chi^2$  y test de Fisher para evaluar la influencia del tipo de multinucleación sobre la tasa de implantación ( $p < 0.05$ ).

### RESULTADOS

245 de los 475 embriones transferidos presentan implantación conocida, de los cuales 32,24% ( $n=79$ ) son KID+ y 67,75% ( $n=166$ ) KID-. Un 46,17%

( $n=113$ ) de dichos embriones presentan blastómeras con errores de nucleación en 2 células.

En el grupo 1, aquellos embriones binucleados ( $n=17$ ) presentan mayor tasa de implantación que los multinucleados ( $n=5$ ), 26,15% vs 7,69% ( $p=0,02$ )

En el grupo 2, se analizaron tres subcategorías, 2 células binucleadas, 2 células multinucleadas, 1 binucleada y la otra multinucleada. No se encontraron diferencias significativas en ninguna de ellas.

### CONCLUSIONES

Embriones con una blastómera multinucleada (más de dos núcleos por célula) tienen una menor tasa de implantación que aquellos que presentan una blastómera binucleada y aquellos con ambas blastómeras con errores de nucleación (binucleadas o multinucleadas).

Serían necesarios más estudios con un mayor número de embriones analizados para confirmar estos resultados.

	Grupo 0	Grupo 1	Grupo 2	TOTAL
KID +	42	22	15	79
KID -	90	43	33	166
TOTAL	132	65	48	245

Tabla 1: Distribución de embriones de acuerdo con su implantación y errores de nucleación

Grupo 1	Binucleadas	Multinucleadas	TOTAL
KID +	17	5	22
KID -	21	22	43
TOTAL	38	27	65

Grupo 2	Binucleadas	Multinucleadas	1 bi + 1 multi	TOTAL
KID +	3	9	3	15
KID -	6	22	5	32
TOTAL	9	31	8	48



## P-010: EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD EMBRIONARIA MEDIANTE ARRAYS DE HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA (ACGH): RESULTADOS CLÍNICOS

I. Campos-Galindo<sup>1</sup>; L. Rodrigo<sup>1,2</sup>; E. Mateu<sup>1</sup>; V. Peinado<sup>1</sup>; M. Milán<sup>1</sup>; S. García-Herrero<sup>1</sup>; M. Vera<sup>1</sup>; P. Mir<sup>1</sup>; N. Al-Asmar<sup>1</sup>; C. Simón<sup>1</sup>; C. Rubio<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>IVIOMICS, Valencia, España.

<sup>2</sup>Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI). Instituto Universitario IVI, Universidad de Valencia, INCLIVA, España.

[inmaculada.campos@iviomics.com](mailto:inmaculada.campos@iviomics.com)

### INTRODUCCIÓN

La utilización de arrays de hibridación de genómica comparada (aCGH) en el cribado genético preimplantacional (del inglés, PGS o CCS), permite el análisis de la dotación cromosómica de los embriones obtenidos mediante fecundación *in vitro*, con el objetivo de mejorar el resultado del tratamiento reproductivo al que se someten pacientes con indicaciones que nos hacen sospechar de una alta proporción de embriones aneuploides.

### OBJETIVOS

Revisar retrospectivamente los resultados clínicos de nuestro programa de cribado genético preimplantacional durante los años 2011 y 2012, mediante la utilización de aCGH como método para la evaluación de la viabilidad embrionaria.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado un total de 1387 ciclos de PGS (CCS). En 507 ciclos la edad materna fue <40 años con las siguientes indicaciones: aborto de repetición (n=204), fallo recurrente de implantación (n=187) y factor masculino (n=116). En los restantes ciclos (n= 880), la edad materna fue ≥40 años.

En todos los ciclos se realizó biopsia embrionaria en el tercer día de desarrollo, y para el estudio del contenido cromosómico, se analizó una única célula de cada embrión utilizando la plataforma de aCGH, *24sure*, (BlueGnome Ltd, Cambridge, UK). Se amplificó el ADN de una blastómera de cada embrión mediante Whole Genome Amplification (WGA) con *Sureplex DNA Amplification System* (BlueGnome Ltd,

Cambridge, UK). El producto del WGA y el ADN genómico usado como control fueron marcados con los fluoróforos Cy3 y Cy5. Ambos ADN fueron co-hibridados durante toda la noche en arrays de la plataforma *24sure* (BlueGnome Ltd, Cambridge, UK). Los arrays fueron escaneados y analizados mediante *BlueFuse Multi software* (BlueGnome Ltd, Cambridge, UK). Los embriones diagnosticados como euploides fueron transferidos en día 5 de desarrollo.

### RESULTADOS

Los resultados para las diferentes indicaciones se muestran en la tabla:

	AR	FI	FM	EMA (≥40 yrs)
Nº de ciclos	204	187	116	880
Edad media (DS)	35,9 (2,7)	36,5 (2,5)	34,8 (3,2)	41,5 (2,1)
Media de embriones analizados (DS)	5,5 (3,1)	5,9 (3,0)	6,8 (3,7)	4,6 (2,6)
% de embriones anormales	68,2	67,7	65,4	85,7
% ciclos con embriones transferidos	76,0	79,1	83,6	40,7
Media de embriones transferidos (DS)	1,5 (0,5)	1,5 (0,6)	1,5 (0,5)	1,3 (0,7)
Tasa de embarazo /transfer	58,1	57,4	62,9	47,5
Tasa de implantación	47,9	50,9	54,2	42,4
Tasa de aborto	13,3	4,7	3,3	6,5

AR, aborto de repetición; FI, fallo repetido de implantación; FM, factor masculino; EMA, edad materna avanzada.

### CONCLUSIONES

La edad materna avanzada fue la indicación más frecuente en nuestro programa de PGS con aCGH. En mujeres <40 años, el porcentaje de embriones anormales varió entre 65,4 y 68,2; mientras que en el grupo ≥40 años, este porcentaje ascendió al 85,7. Como consecuencia, en mujeres <40 años el porcentaje de ciclos con transferencia de al menos un embrión normal osciló entre el 76,0 y 83,6 y en mujeres de ≥40 años, fue del 40,7 %. Sin embargo,

independientemente de la edad materna, se obtuvieron unas elevadas tasas de embarazo clínico evolutivo para todas las indicaciones, con los mejores resultados en factor masculino severo.

## P-011: CORRELACIÓN ENTRE ANEUPLOIDIA, MARCADORES APOPTÓTICOS Y FRAGMENTACIÓN DE DNA EN ESPERMATOZOIDES: ¿CASUALIDAD O CAUSALIDAD?

M. Ferrer<sup>1,5</sup>, M. Ruiz Jorro<sup>1,5</sup>, E. Garcia Mengual<sup>2</sup>, P. Muñoz<sup>1,5</sup>, J.C Triviño<sup>3</sup>, C.Calatayud<sup>1,5</sup>, V.Y.Rawe<sup>1,4</sup>, X. Vendrel<sup>2</sup>

<sup>1</sup> CREA. Centro médico de Reproducción Asistida. València. <sup>2</sup> Sistemas Genómicos S.L. Unidad de Genética Reproductiva. València. <sup>3</sup> Sistemas Genómicos S.L. Unidad de Bioinformática. València. <sup>4</sup> REPROTEC. Buenos Aires. Argentina. <sup>5</sup> ANACER. Asociación nacional de clínicas de reproducción asistida.

[minerva.ferrer@creavalencia.com](mailto:minerva.ferrer@creavalencia.com)

### INTRODUCCIÓN

La integridad del DNA espermático es un requisito esencial para garantizar su competencia reproductiva. No obstante, el mismo proceso de espermatogénesis implica cambios fisiológicos que pueden afectar esta integridad. Concretamente, procesos como la protaminación y la apoptosis han sido ampliamente estudiados. Además del daño en el DNA, elevados niveles de aneuploidías han sido relacionados con fallos repetidos en tratamientos de reproducción. En consecuencia, el espermograma convencional se ha ido ampliando con pruebas moleculares para evaluar el estado del genoma espermático. El uso de estrategias de selección de espermatozoides *sanos* es cada vez más frecuente en la práctica diaria. La aplicación de MACS permite eliminar de una muestra los espermatozoides apoptóticos. Sin embargo, la interacción entre marcadores apoptóticos, fragmentación del DNA y aneuploidía, y el efecto de las MACS sobre estos parámetros sigue siendo desconocido. El objetivo del presente estudio fue analizar una posible relación, no casual, entre aneuploidía y apoptosis en espermatozoides.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron de manera prospectiva niveles de fragmentación, marcadores apoptóticos y aneuploidía, antes y después de la aplicación de MACS, en muestras de seis pacientes normozoospermicos (OMS-V-2010) de parejas diagnosticadas de fallo de implantación.

El estudio de aneuploidía se realizó mediante FISH (cr. 18, X, Y). La fragmentación (TUNEL) y los marcadores apoptóticos (Fosfatilserina externalizada - *ePS* y disrupción del potencial de membrana mitocondial -  $\Delta\Psi m$ ) se evaluaron mediante citometría de flujo. Se analizaron alícuotas de la muestras en fresco (F), después de gradientes de densidad (post DGC) y después de MACS (post MACS)

Los datos se analizaron mediante *R statistical platform* (<http://cran.r-project.org/>). El test no paramétrico de Wilcoxon, de una cola para muestras apareadas, se utilizó para el contraste estadístico. La relación entre fragmentación de DNA, *ePS*,  $\Delta\Psi m$  y aneuploidía se estudió usando el coeficiente de correlación de Pearson. Se consideró significancia estadística cuando  $P < 0.05$ .

### RESULTADOS

El número de espermatozoides aneuploides, apoptóticos y con DNA fragmentado disminuye después de la aplicación de MACS.

Se observó una reducción significativa ( $P < 0.05$ ) en la tasa de aneuploidía total entre la fracción F y post DGC ( $7,10 \pm 2,92$ ;  $5,13 \pm 2,22$ ), así como entre post DGC y post MACS ( $5,13 \pm 2,22$ ;  $4,22 \pm 2,52$ ).

El ensayo de TUNEL reveló una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) de células fragmentadas después de MACS: post- DGC  $75,77 \pm 14,73$  vs post MACS  $2,84 \pm 3,09$ .

La proporción de células no apoptóticas también se incrementó

significativamente ( $P < 0.05$ ) tras MACS: *ePS*- : post- DGC  $15,79 \pm 17,89$  vs post MACS  $78,72 \pm 25,26$  y  $\Delta\Psi m$ - : post- DGC  $23,82 \pm 27,70$  vs post MACS  $63,53 \pm 26,21$ .

Se observó una correlación positiva entre la reducción de aneuploidías y la fragmentación del DNA ( $R = 0,75$ ;  $P < 0.05$ ). Para los marcadores apoptóticos, no se observó correlación ni con aneuploidías (*ePS*- :  $R = -0,43$  y  $\Delta\Psi m$ - :  $R = -0,36$ ;  $P < 0.05$ ), ni con fragmentación de DNA (*ePS*- :  $R = -0,04$ ;  $P < 0.05$  y  $\Delta\Psi m$ - :  $R = -0,39$ ;  $P < 0.05$ ). No se observó correlación entre *ePS*- y  $\Delta\Psi m$ - ( $R = 0,09$ ;  $P < 0.05$ ).

### CONCLUSIONES

En el grupo de pacientes estudiado, la aplicación de MACS permite obtener una población de espermatozoides con una menor incidencia de aneuploidías.

Este hecho podría explicarse por la existencia de una relación, no casual, entre apoptosis y aneuploidía en espermatozoides.

## P-012: SCREENING GENÉTICO EN DONANTES DE OVOCITOS: EXPERIENCIA EN EL ESTUDIO DE 350 DONANTES

M. Martínez-Fresno; E. Sánchez; A. Gómez; P. Eibes; E. Fernández  
Geniality Diagnóstico Genético, Madrid  
[mmfresno@geniality.es](mailto:mmfresno@geniality.es)

### INTRODUCCIÓN

El Screening genético en donantes de gametos tiene como finalidad reducir el riesgo de transmisión de enfermedades genéticas a la descendencia. En España estos estudios están regulados por el Real Decreto 14/2006, donde se contempla que los donantes no deben padecer enfermedades genéticas, hereditarias o infecciosas transmisibles a la descendencia, sin enumerar los estudios que deben llevarse a cabo. Sin embargo, las distintas organizaciones y sociedades internacionales (Organización Mundial de la Salud, American Society for Reproductive Medicine, Human Fertilisation and Embryology Authority y British Andrology Society) que se han pronunciado al respecto recomiendan el consejo genético al donante, realizar el cariotipo para detectar alteraciones cromosómicas y un Screening de mutaciones en enfermedades autosómicas recesivas que dependerán del grupo étnico.

**El objetivo** de este estudio, es evaluar la utilidad clínica de la inclusión del consejo genético, cariotipo y Screening de Fibrosis Quística y X-Frágil en los programas de donación de gametos.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Entre Julio-2011 y Mayo-2013, se estudiaron 350 donantes de ovocitos con una edad media de 25 años. Las procedencias fueron: España(281), Sudamérica/Centroamérica(36), Europa del Este(27), Alemania(2), Marruecos(2), Nigeria(1) e Irán(1). Las pacientes cumplimentaron un cuestionario de asesoramiento genético que permitió valorar su procedencia geográfica familiar, historia clínica personal y familiar,

así como recomendar una serie de estudios en función de su grupo étnico. Pasado este primer filtro, se realizaron tres pruebas de manera rutinaria: Cariotipo, Screening X-frágil y Screening de mutaciones en Fibrosis Quística.

### RESULTADOS

De las 350 donantes incluídas en el estudio, 310 (88,6%) resultaron aptas para la donación de gametos, mientras que un 11,4% (n=40) recibieron un resultado de no apta. Tras la evaluación del cuestionario de asesoramiento genético (n=348), se realizaron recomendaciones en 87 cuestionarios, como por ejemplo ampliar la información para descartar hipercolesterolemia familiar, epilepsia, cáncer familiar, etc. y 8 donantes (2,3%) resultaron no aptas por diversas causas, como adoptada, aborto espontáneo previo, hijo con malformaciones, cáncer de mama en familiar de primer grado, etc. Tras el estudio del cariotipo (n=314), 6 donantes (1,92%) presentaron cariotipo alterado (46,XX,inv(9)(p11p13); 46,XX,inv(9)(p11q21.2); 46,XX,inv(8)(p23.1;q13); 46,XX,13p+; 46,XX;45,X; 46,XX,14p+). En el Screening de Fibrosis Quística (n=343), 24 donantes (7%) resultaron portadoras (2 F508del; 1 S549R y 21 polimorfismo 5T) siendo no aptas. En Screening de premutación de X-frágil (n=334) únicamente en 3 donantes (0,89%) se detectó una premutación (2 casos de 51 repeticiones y uno de 56 repeticiones), no siendo ninguna de estas de elevado riesgo de expansión, aunque fueron consideradas no aptas.

### CONCLUSIONES

Existe una proporción significativa de donantes no aptas para la donación

de gametos (11,4%). La inclusión de pruebas diagnósticas en un test de cribado es necesaria y debe evaluarse en función de su frecuencia poblacional según etnia geográfica, su sensibilidad clínica definida como la proporción de individuos que tienen un genotipo concreto y que son detectadas por ese test (donantes no aptas) y el coste/beneficio de su inclusión. Según nuestra experiencia, la inclusión de la consulta o cuestionario de consejo genético debería ser obligado, así como el Screening de Fibrosis Quística y el cariotipo. Si bien el Screening de X-Frágil presenta una alta sensibilidad clínica no estaría justificado por la frecuencia de portadores encontrada (0,89%), sin embargo el desarrollo de nuevos test basados en la tecnología Next Generation Sequencing (NGS) nos permitirá incluir en el panel de cribado el estudio de enfermedades frecuentes en distintas etnias, así como incluir otras como el Screening de la Atrofia Muscular Espinal recomendado por el American College of Medical Genetics (ACMG) o el Screening de X-Frágil sin que ello repercuta en gran medida en el coste.

## P-013: EFECTO DE LAS BAJAS CONCENTRACIONES DE OXIGENO EN FUNCIÓN DEL TIPO DE INCUBADOR UTILIZADO EN CULTIVOS SECUENCIALES

M. Martínez Burgos, C. Losada, S. Pareja, A. Martínez, D. Agudo, F. Bronet  
IVI Madrid, Aravaca-Madrid  
[monica.martinez@ivi.es](mailto:monica.martinez@ivi.es)

### INTRODUCCIÓN

El cultivo a blastocisto, frente a la transferencia en D3, ofrece al embriólogo una información adicional de gran ayuda para la selección embrionaria, por lo que está siendo cada vez más utilizado en los laboratorios de reproducción asistida. En estos casos es fundamental optimizar en cada laboratorio las condiciones de cultivo hasta obtener unas buenas tasas de desarrollo a blastocisto. Trabajos previos parecen indicar que factores como la concentración de oxígeno o el tipo de incubador pueden afectar a este desarrollo.

### OBJETIVOS

Evaluar los efectos del cultivo a bajas concentraciones de oxígeno utilizando tres tipos diferentes de incubadores.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Realizamos un estudio retrospectivo sobre 301 ciclos de cultivo secuencial desde el 15/12/2011 hasta el 15/3/2013. En medio Global Total fueron cultivados 2807 cigotos y distribuidos en cuatro incubadores con las siguientes condiciones: (1) 579 cigotos en Embryoscope (6% CO<sub>2</sub> en aire, con aproximadamente 20% O<sub>2</sub>), (2) 589 en Embryoscope (6% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y 89% N<sub>2</sub>), (3) 550 en Cook MINC (gas premezclado con 6% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y 89% N<sub>2</sub>) y (4) 1089 en Heracell 150i (6% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y 89% N<sub>2</sub>).

### RESULTADOS

Nuestros resultados muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) tanto en tasa de formación de blastocistos totales y viables como en tasa de blastocistos de buena calidad en D5 a favor del cultivo en bajas

	(1) EMBRYOSCOPE	(2) EMBRYOSCOPE TRI-GAS	(3) MINC TRI-GAS	(4) CONVENCIONAL TRI-GAS
Nº ciclos	55	56	61	129
Nº cigotos	579	589	550	1089
BT totales/cigotos	55,61(579) <sup>a,b,d,f,g</sup>	72,84(589)	72,91(550)	67,31 (1089)
BT viables/cigotos	42,14(579) <sup>a,b,d</sup>	55,86(589)	57,27(550)	55,00 (1089)
BT viables/BT totales	75,78(322) <sup>e,f</sup>	76,69(429)	78,55(401)	81,72 (733)
BT buena calidad (A/B) en D5	34,62(300) <sup>a,b,d</sup>	48,91(384)	53,02(364)	51,20 (666)
BT expandidos D5	49,00(300)	53,91(384)	49,73(364)	49,25 (666)
Tasa implantación	41,18(85) <sup>c</sup>	45,26(95)	57,89(95)	51,25 (160)
	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)

<sup>a</sup> $p < 0,01$  (1 vs 2), <sup>b</sup> $p < 0,01$  (1 vs 3), <sup>c</sup> $p < 0,05$  (1 vs 3), <sup>d</sup> $p < 0,01$  (1 vs 4), <sup>e</sup> $p < 0,05$  (1 vs 4), <sup>f</sup> $p < 0,05$  (2 vs 4), <sup>g</sup> $p < 0,05$  (3 vs 4)

concentraciones de oxígeno para los tres incubadores analizados. Sin embargo al comparar entre incubadores trigas se ve un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en la tasa de blastocistos totales en los incubadores de sobremesa o cerrados (2 y 3) frente al convencional (4).

Todos los incubadores muestran unas altas tasas de implantación encontrándose diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los incubadores 1 y 3, a favor de MINC tigas.

### CONCLUSIONES

La combinación de bajas concentraciones de oxígeno e incubadores de sobremesa capaces de controlar y restaurar rápidamente las condiciones de cultivo embrionario ofrecen los mejores resultados para el cultivo a blastocisto en nuestro centro.

## P-014: SELECCIÓN EMBRIONARIA: COMPARACIÓN ENTRE LOS CRITERIOS MORFOLÓGICOS Y LOS CRITERIO CINÉTICOS

S. G-Oro; I. Rey; A. Durán; E. Guerra; F. L - Roibal; R. Devesa.

Unidad de Reproducción Asistida, Equipo Ron – Hospital Quirón A Coruña, A Coruña

[sabela.oro@quiron.es](mailto:sabela.oro@quiron.es)

### INTRODUCCIÓN

Una parte muy importante en los ciclos de fecundación *in vitro* es la selección embrionaria. La elección de el/ los embriones más adecuados para transferir/vitrificar es un paso clave para garantizar el éxito de un ciclo. Además, la tendencia actual de reducir el número de embriones por transferencia para evitar o minimizar los embarazos múltiples, nos exige contar con un buen criterio de selección embrionaria.

Hasta hace poco, los únicos datos que teníamos para seleccionar los embriones eran morfológicos (nº y tamaño celular, ritmo de división, fragmentación, multinucleación....) y por lo tanto no exentos de cierta subjetividad. Con la reciente introducción de los sistemas de incubación "time-lapse" se introduce un nuevo parámetro de selección, objetivo y preciso, la cinética embrionaria.

### OBJETIVO

La finalidad de este estudio es comparar la clasificación morfológica (Criterios de ASEBIR) con la clasificación cinética (Messeguer et al, 2011) en el mismo *pool* de embriones.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se han evaluado los embriones transferidos de 209 ciclos (ciclos propios de mujeres menores de 40 años y ciclos de donación de ovocitos) desde enero de 2012 a enero de 2013. Se han tenido en cuenta sólo las transferencias de día 3 y día 5 que a su vez fuesen informativas (transferencia de 1 embrión: si/no embarazo, transferencia de 2 embriones: no embarazo/embarazo con 2 sacos gestacionales). De los 209 ciclos, 117 han sido informativos (total de embriones informativos: 183)

Todos los embriones transferidos han sido incubados en el Embryoscope. Cada embrión se ha clasificado siguiendo los criterios de ASEBIR y los criterios cinéticos. De forma retrospectiva se ha comparado la tasa de implantación de cada grupo dentro de cada clasificación.

### RESULTADOS

Hemos clasificado los 183 embriones informativos en las 10 categorías de la clasificación cinética y en las 4 de Asebir. En cada categoría hemos calculado la tasa de implantación. Los resultados obtenidos son los siguientes:

Clasificación Cinética: A+: 21/40 (52,5%), A-: 5/16 (31,2%), B+: 6/14 (42,8%), B-: 2/5 (40%), C+: 19/56 (33,9%), C-: 2/11 (18,2%), D+: 1/17 (5,9%), D-: 0/7 (0%), E: 0/6 (0%), F: 0/11 (0%)

Clasificación Asebir: A: 10/26 (38,5%), B: 28/83 (33,7%), C: 16/54 (29,6%), D: 2/20 (10%)

Lo más representativo de la clasificación cinética es la elevada tasa de implantación de los embriones A+ y la nula tasa de implantación de los embriones D-, E y F. Además, si escogemos como principal criterio de selección embrionaria el T5 (tiempo en el que los embriones se dividen a 5 células), las diferencias en la tasa de implantación de los embriones con un T5 óptimo (A+, A-, B+, B-) y un T5 no óptimo (C+, C-, D+, D-) son claramente significativas (TI: 45,3% vs 24,2%) ( $p=0.004$ ).

Si comparamos los embriones de buena calidad seleccionados con la clasificación cinética (T5 óptimo), con los embriones de buena calidad seleccionados exclusivamente con criterios morfológicos (A y B), observamos una

mayor tasa de implantación en aquellos embriones que cumplen el T5 (TI: 45,3% vs 34,9%) aunque las diferencias no son significativas ( $p=0.15$ ).

### CONCLUSIONES

La introducción de los parámetros cinéticos como criterio de selección embrionaria es de gran utilidad a la hora de escoger los embriones con mayor potencial de implantación. En nuestro caso particular, el T5 es el principal criterio de selección embrionaria.



## P-015: LA CAPACITACIÓN POR GRADIENTES DE DENSIDAD PREVIA A LA CRIOPRESERVACIÓN MEJORA LA CALIDAD ESPERMÁTICA RECUPERADA

A. Fabregat<sup>1</sup>; L. Sánchez-Pacheco<sup>1</sup>; JA. Ortiz<sup>1</sup>; B. Lledó<sup>1</sup>; J. Ten<sup>1</sup>; J de Juan<sup>1,2</sup>; R. Bernabeu<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Instituto de Fertilidad Bernabeu, Alicante,  
<sup>2</sup>Catedra de Medicina Reproductiva, Dpto. Biotecnología, Universidad de Alicante, Alicante  
[afabregat@institutobernabeu.com](mailto:afabregat@institutobernabeu.com)

### INTRODUCCIÓN

La criopreservación seminal es una técnica que consiste en la congelación y almacenamiento de espermatozoides con fines reproductivos y cuyo objetivo es mantener la viabilidad y funcionalidad a bajas temperaturas durante largos períodos de tiempo. Se han desarrollado diferentes métodos de congelación seminal, pero un problema común a todos ellos sigue siendo la pérdida de calidad del semen en términos de recuento, motilidad y fragmentación de ADN espermático una vez descongelado. Generalmente el semen se congela en fresco y se capacita una vez ya descongelado previa utilización para las técnicas de reproducción asistida. Una alternativa a tener en cuenta es congelar el semen ya capacitado. De este modo, además de eliminar las células redondas y otros detritos existentes en el plasma seminal que podrían afectar negativamente a los espermatozoides, también se dispondría de muestras de semen ya listas para su uso, por lo que reduciría notablemente la carga de trabajo de los laboratorios de fecundación in vitro y andrología.

### OBJETIVOS

El objetivo primario del estudio es comparar la calidad del semen de donantes tras la descongelación en muestras congeladas en fresco versus capacitadas por gradientes de densidad. Como objetivo secundario se plantea calcular el índice de fragmentación y la velocidad de fragmentación del ADN espermático por hora y comparar las muestras en fresco y las capacitadas tanto antes como después de la congelación seminal.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron 6 muestras de semen de un total de 6 varones procedentes del banco de semen del centro. Tras la licuefacción, cada muestra se dividió en dos alícuotas. Una de ellas se mantuvo en fresco, mientras que la otra se capacitó por gradientes de densidad utilizando Puresperm (Nidacon®). Las muestras fueron homogéneas en cuanto a concentración espermática. Se realizaron extensiones en portas a tiempo 0h y 6h de ambas muestras. Las muestras fueron criopreservadas en vapores de nitrógeno rellenando pajuelas de 0,5 mL. La calidad espermática en términos de recuento y motilidad se analizó utilizando la cámara Mackler y la fragmentación del ADN espermático se midió con la técnica de TUNEL. Todas las variables fueron analizadas tanto antes como después de la congelación seminal. Debido a la distribución no normal de los datos, éstos fueron comparados con el test Wilcoxon para muestras apareadas mediante SPSS Statistics 20.0.

### RESULTADOS

Se observó una diferencia significativa ( $p=0,028$  IC=95%) entre los dos tipos de procesamiento de las muestras en términos de recuento y motilidad espermática en semen descongelado. En cuanto a la fragmentación de ADN, se observó una menor fragmentación espermática basal y una menor velocidad de fragmentación tras la descongelación en muestras congeladas capacitadas, aunque esta diferencia no alcanzó la significación estadística.

### CONCLUSIONES

Los datos del estudio apuntan hacia la conveniencia de la criopreservación

seminal tras la capacitación del semen fresco, ya que se evidencia una mayor recuperación de espermatozoides móviles tras la descongelación que muestra significación estadística. Los resultados de nuestro estudio sugieren que esta capacitación previa selecciona a los espermatozoides menos fragmentados y tiende a estabilizar el patrón dinámico de aumento de daño en el ADN producido en las primeras 4h post-descongelación a 37°C. Como consecuencia del breve periodo de reclutamiento de donantes y de su diseño experimental prospectivo, el tamaño de la muestra constituye una de las principales limitaciones del estudio por lo que se propone ampliar dicho estudio con un mayor número de muestras y evaluar la fertilidad de dichos donantes ya que actualmente están en cuarentena.

## P-016: CLASIFICACIÓN ASEBIR: ¿VÁLIDA PARA TODOS LOS CASOS?

C. Romero, C. Olmedo, A. Coello, A. García, I. Cuevas  
Hospital General Universitario, Valencia.  
[icuevassaiz@yahoo.es](mailto:icuevassaiz@yahoo.es)

### INTRODUCCIÓN

La Asociación para el Estudio de la Biología Reproductiva (ASEBIR) estableció en el año 2007 una clasificación con cuatro categorías diferentes, para clasificar los embriones antes de su transferencia. Esta clasificación fue llevada a cabo mediante un estudio multicéntrico, donde se compararon datos de diferentes centros de reproducción asistida nacionales.

Se planteó en nuestro laboratorio conocer si los embriones seleccionados por criterios morfológicos para su transferencia (número de células, simetría y yuxtaposición de los pronúcleos, grado de fragmentación, presencia de vacuolas, zona pelúcida...), coincidían con la clasificación ASEBIR. De este modo, se comenzaron a recopilar datos desde Junio de 2012.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron de forma retrospectiva las cohortes de embriones de 80 pacientes, sumando un total de 153 embriones transferidos entre Junio de 2012 y Abril de 2013. Los datos fueron analizados con los programas *FileMaker Program* y *Sara 1.0*.

### RESULTADOS

Una vez analizados los datos, vimos que de los 153 embriones transferidos, 40 fueron de tipo A, 37 de tipo B, 42 de tipo C y 33 de tipo D. De manera que no se observaron diferencias importantes entre el número de embriones transferidos de cada categoría ASEBIR.

De las 80 transferencias:

- 35 de los 80 pacientes estudiados tenían embriones de tipo A (43,75%), siendo estos transferidos en el 80% de los casos.
- 23 pacientes disponían de embriones de tipo A y B (28,75%), siendo estos transferidos en el 82,60% de los casos.
- 34 pacientes sólo contaban con embriones C y/o D (42,5%).

Sólo 12 pacientes incluían en su cohorte, embriones de tipo A, B, C y D (15%). Siendo transferidos los de tipo A y B, en el 75% de los casos.

### CONCLUSIONES

Bajo estas condiciones cabía suponer que el número de embarazos logrados con embriones de tipo A y B, sería

significativamente superior a los logrados con embriones C y/o D. Sin embargo de los 32 ciclos que dieron una beta positiva, 3 resultaron de transferir embriones de tipo A, 13 de transferir embriones A+B, 10 de transferir embriones de tipo C+D, y 6 de la combinación (A/B) + (C/D).

Según estos resultados, a pesar de que los embriones de tipo A y B fueron transferidos 3 veces más que el resto, la probabilidad de que estos implanten es igual a la de los embriones de categoría C y D. Pensamos que esto es debido a que algunos dismorfismos embrionarios penalizados en la clasificación ASEBIR, no coinciden plenamente con nuestra clasificación, donde tenemos en cuenta que según el *``timing``* embrionario algunas características son consideradas fisiológicas (por ejemplo fragmentación tras la división y la multinucleación en dos células).

Como conclusión a nuestro estudio creemos que todos los laboratorios de embriología coincidiríamos en los patrones A y B de clasificación embrionario, sin embargo, en los patrones C y D habría más discrepancias. Por ello creemos necesario reevaluar la clasificación ASEBIR para la asignación a la baja según determinados dismorfismos.

## P-017: MEJORA DE LA SUPERVIVENCIA TRAS LA VITRIFICACIÓN DE BLASTOCISTOS MEDIANTE COLAPSO PARCIAL CON UNA MANIOBRA NUEVA, SENCILLA, RÁPIDA Y NO INVASIVA

L. Mifsud; M. Barea; M. Martínez; J. Íñiguez  
Quirón Torrente, Torrent, Valencia.  
[info.torrent@quiron.es](mailto:info.torrent@quiron.es)

### INTRODUCCIÓN

Son diversos los artículos que hablan de la importancia del volumen del blastocele en el resultado final

de la vitrificación de blastocistos, atribuyéndose una correlación negativa en los resultados en función del volumen del mismo por una mayor probabilidad de formación de cristales

de hielo al no producirse una correcta deshidratación.

Se han descrito múltiples las técnicas encaminadas a reducir el volumen del

mismo antes de la vitrificación (láser, aspiración directa del blastocele, micropipeteo, punción, etc.). Sin embargo, todas estas técnicas conllevan la realización de un método invasivo para el embrión. En este trabajo se propone la aplicación de una nueva forma de provocar el colapso que no conlleva acción invasiva sobre el embrión.

#### OBJETIVO

Evaluar si el método propuesto para la reducción del volumen del blastocele aumenta la supervivencia tras la vitrificación.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio retrospectivo sobre 64 blastocistos vitrificados en

D5/D6 que fueron divididos en dos grupos: Grupo A (colapsados) con una N=35 y Grupo B (sin colapsar) con una N=29. El proceso de colapso consistió en proporcionar "golpecitos" a la placa durante el tiempo de equilibrado, hasta observarse, prácticamente de manera espontánea, una invaginación del trofoectodermo y un vaciado del blastocele. La vitrificación/desvitrificación se realizó de la misma forma para ambos grupos (Vit Kit Freeze / Vit Kit Thaw, IrvineScientific) y el soporte utilizado fue el Cryotip.

El análisis se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS 11.0 y utilizamos la prueba de Mann-Whitney para el estudio estadístico siendo considerado estadísticamente significativo  $p < 0,05$ .

#### RESULTADOS

Se obtuvo un resultado estadísticamente significativo ( $p = 0,047$ ), en cuanto a la tasa de supervivencia entre el grupo al que se aplicó el colapso y al que no se le aplicó.

#### CONCLUSIONES

A la vista de los resultados, y sabiendo que esta práctica, no supone ningún tipo de manipulación directa sobre el embrión, se plantea la posibilidad de ampliar este trabajo realizando un estudio prospectivo, randomizado para confirmar la eficacia de la técnica y plantear la posibilidad de instaurarla como maniobra de rutina en la vitrificación de blastocistos para diferentes soportes y medios de vitrificación, existentes actualmente en el mercado.

## P-018: CULTIVO EMBRIONARIO TIME-LAPSE: BÚSQUEDA DE NUEVOS INDICADORES CINÉTICOS DE IMPLANTACIÓN EN EL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO DE EMBRIOGYN

I. Espelta<sup>1</sup>, T. Planella<sup>2</sup>, P. Feliu<sup>2</sup>, C. Vives<sup>2</sup>, T. Sagués<sup>3</sup>, M. Mulero<sup>3</sup>, I. Saumell<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Alumna de Bioquímica i Biologia Molecular de la URV en prácticas.

<sup>2</sup> Embriogyn, Centre de Reproducció Assistida i Diagnòstic Prenatal.

<sup>3</sup> Profesor del departamento de Bioquímica i Biotecnologia de la URV, Tarragona  
[isaumell@embriogyn.com](mailto:isaumell@embriogyn.com)

La recién puesta en marcha del sistema de incubación time-lapse es uno de los últimos avances más importantes en los laboratorios de fecundación *in vitro*. Este sistema permite analizar los datos recogidos en la secuencia de fotogramas de cada embrión a través de un software específico. La bibliografía reciente demuestra que dicho sistema aporta nueva información sobre el uso de los parámetros cinéticos y la probabilidad de implantación. Por otro lado, sabemos que en cada laboratorio pueden existir variables que afecten de forma diferente al desarrollo de los embriones como los sistemas de cultivo, manipulación embrionaria, etc. Es por ello que nos hemos propuesto estudiar los parámetros cinéticos más influyentes en el comportamiento de los embriones en nuestro laboratorio y su relación con la capacidad de implantación. El

objetivo de este estudio es establecer un sistema de valoración propio para implementarlo en la clasificación rutinaria del laboratorio, optimizando así la selección embrionaria.

Para ello hemos analizado 152 embriones procedentes de 99 ciclos de Fecundación *in vitro* mediante ICSI en Embriogyn (Tarragona), e incubados en un sistema time-lapse (Embryoscope®). De todos ellos conocemos el porcentaje de implantación clínica ( $\bar{x}=52\%$ ) ya que hemos seleccionado embriones procedentes de transferencias en las cuales han implantado todos los embriones (100% implantación) o ninguno (0% implantación). Los ovocitos de los que proceden los embriones analizados son tanto propios ( $n=88$ ) como de donante ( $n=64$ ); debido a que el análisis de variancia

mostró que no había diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes parámetros cinéticos estudiados y el origen del ovocito ( $p > 0,05$ ). Estos parámetros cinéticos comprenden desde la aparición de los pronúcleos hasta la división de la octava célula, así como las diferencias entre las divisiones. De los 17 parámetros analizados, los tres estadísticamente más significativos ( $p < 0,05$ ) después del análisis de variancia fueron cc3 (t6-t5), s2 (t4-t3) y cc3f (t5-PNFading). Estos tres parámetros han sido ordenados jerárquicamente en función de su significancia ( $p=0.001$ ,  $p=0.002$  y  $p=0.022$ ) generando un árbol de clasificación en los que actúan como variables (primaria, secundaria y terciaria) y distribuyen los embriones en ocho categorías según su capacidad de implantación.

Para establecer los rangos en el árbol jerárquico, se han dividido los tiempos de cada parámetro en cuatro percentiles (p25, p50, p75 y p100), y se ha tomado como el intervalo óptimo el comprendido entre los percentiles p25 y p75 de los embriones con 100% implantación. Además, para asegurar la validez de este nuevo modelo, se ha comprobado una tendencia lineal decreciente estadísticamente significativa entre las categorías mediante la prueba de

chi-cuadrado de Mantel-Haenzel ( $X^2_{\pi}$ ), ( $p < 0.01$ ).

Entendemos este trabajo como un estudio preliminar debido al número de embriones analizados; ya que es lógico pensar que, en una muestra mayor puedan verse modificados los rangos óptimos y los parámetros que se manifiestan como más significativos. Aun así, en espera de ampliar el estudio, hemos incorporado el árbol obtenido

para la selección embrionaria. Por otro lado, la aplicación de este sistema también nos permite la incorporación al análisis cinético de los embriones procedentes de FIV-conventional, por la naturaleza de las variables estudiadas. Los resultados sugieren que sería muy positivo que cada laboratorio de fecundación *in vitro* dispusiera de un sistema de clasificación propio ajustándose a sus parámetros cinéticos específicos.

## P-019: EL USO DEL FACTOR DE COLONIAS DE GRANULOCITOS Y MACRÓFAGOS (GM-CSF) EN EL CULTIVO EMBRIONARIO MEJORA LA CALIDAD EMBRIONARIA Y AUMENTA LAS TASAS DE EMBARAZO

Y. Franco Iriarte; MJ. Iñarra; K. Palacín; A. Gueembe; B. Murillo; C. Puyo; V. Jiménez.  
Centro Sanitario Virgen del Pilar de San Sebastián  
[josufranco@hotmail.es](mailto:josufranco@hotmail.es)

### INTRODUCCIÓN

En la actualidad los factores inmunológicos (citoquinas) empiezan a tener mayor relevancia debido a que su función principal es la de regular la comunicación e interacción existente entre las células del sistema inmune y el resto de células del cuerpo humano. Una de estas citoquinas es el factor de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) que se expresa de forma abundante en el oviducto así como en el endometrio alcanzando su concentración máxima durante el periodo de fecundación e implantación del embrión. Las condiciones *in vitro* a las cuales se desarrollan los embriones son generalmente consideradas como condiciones subóptimas. La suplementación de los medios de cultivo con citoquinas y factores de crecimiento parecen promover el crecimiento y un mejor desarrollo de los embriones humanos, duplicando el número de embriones capaces de alcanzar el estadio de blastocisto. Los estudios realizados en modelos animales muestran que el GM-CSF promueve una mayor supervivencia y diferenciación de blastómeras, garantiza una mayor tolerancia del Sistema Inmune materno a los antígenos del embrión y futuro feto y

contribuye a la diferenciación de las células del trofoblasto para formar la placenta.

### OBJETIVOS

Evaluar la eficiencia y beneficios del cultivo embrionario con el factor GM-CSF en pacientes abortadoras de repetición, con fallos de implantación y embarazos bioquímicos.

### MÉTODOS

En nuestro laboratorio de embriología hemos implementado desde agosto de 2012 en el cultivo de embriones la utilización del factor GM-CSF. Un total de 28 parejas han sido estudiadas hasta el momento. De estas 28 parejas, 17 habían sido sometidas a tratamientos previos de fecundación sin resultado de niño en casa, 8 parejas habían sufrido abortos de repetición y tres parejas sufrieron embarazos bioquímicos. La calidad embrionaria de estas 28 parejas, siguiendo los criterios de ASEBIR, fue: 30% de calidad A, 37% de B, 23% de tipo C y 10% de tipo D. En la mayoría de los casos la transferencia de embriones se realizó en D+3 utilizando el factor GM-CSF como medio de transferencia siendo el resto de embriones cultivados a estado de blastocisto.

### RESULTADOS

Los resultados preliminares de este estudio muestran un test de embarazo positivo en 21 de las 28 parejas analizadas (75%). Analizando por grupos observamos que en parejas con fallos previos de implantación el porcentaje de embarazo es de un 76% (13/17), en abortadoras de repetición 75% (6/8) y en embarazos bioquímicos 66% (2/3).

Tras comparar la calidad embrionaria se observa una mejora en el momento de la transferencia: 43% de embriones de calidad A, 40% de B y 17% de C, no habiendo embriones de calidad D. Además en 5 casos se realizó vitrificación de los embriones sobrantes en estado de blastocisto.

### CONCLUSIONES

El uso del factor GM-CSF en el cultivo de embriones humanos resulta efectivo ya que se logra un incremento en la tasa de implantación del embrión en los tres grupos estudiados, embarazo clínico y una mejora en la calidad embrionaria. Nuestros resultados hasta el momento avalan los estudios realizados en animales y humanos por otros autores obteniendo en nuestro centro una mayor tasa de implantación y de embarazo por ciclo.

## P-020: LA COMBINACIÓN DE MORFOLOGÍA Y MORFOCINÉTICA POR “TIME-LAPSE” MEJORA LOS CRITERIOS DE SELECCIÓN EMBRIONARIA

A. Galán, I. Rubio, J. Herrero, A. Tejera, J.M. De los Santos, M. Meseguer  
IVI Valencia, Valencia, España  
[arancha.galan@ivi.es](mailto:arancha.galan@ivi.es)

### INTRODUCCIÓN

La evaluación de los embriones humanos para la transferencia se basa en rasgos morfológicos y tasas de desarrollo que, independientemente de la clasificación utilizada, son subjetivos y dependen del observador. La introducción de la morfocinética embrionaria mediante tecnología time-lapse hace posible el uso estos datos como criterio para seleccionar los embriones en función de sus parámetros cinéticos (tiempos exactos en los que las divisiones se producen) además de la morfología.

Tanto el modelo ASEBIR combinado con la división temprana, como el modelo TLC (time lapse categorization) propuesto por Meseguer en 2011, son capaces de clasificar la calidad embrionaria por categorías, pero el sistema más eficaz para clasificar y seleccionar los mejores embriones para transferir es la combinación de ambos.

### OBJETIVO

Evaluación de los resultados obtenidos en función del sistema usado para clasificar los embriones humanos: criterios morfológicos incluyendo la división temprana o morfología combinada con cinética.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo sobre un total de 1521 embriones transferidos de 946 primeros ciclos de ICSI realizados entre julio de 2009 y agosto de 2012 en IVI Valencia. Analizamos la selección embrionaria en base a resultados de implantación (cuando el número de sacos gestacionales coincide con el número de embriones transferidos): 432 embriones con 100% implantación y 1089 embriones sin implantación.

Los embriones transferidos fueron seleccionados de acuerdo a criterios morfocinéticos (teniendo en cuenta cinco categorías, de la A a la E), mediante un sistema time-lapse de vigilancia (Embryoscope™, Fertilitech, Dinamarca) y se han clasificado según ASEBIR incluyendo la división temprana (con cuatro categorías, de la A a la D). Las coincidencias en la categorización entre ambos modelos y las tasas de implantación fueron analizadas.

### RESULTADOS

Una vez clasificados por ASEBIR, la asignación entre los grupos fue heterogénea (52,6 % de los embriones fueron asignados al grupo “B”), mientras que la clasificación TLC entre los cinco grupos fue mucho más homogénea (31,3 % “A”, 16,1 % “B”, 23,3 % “C”, 10,3 % “D” y el 19,0 % “E”).

Al comparar ambos modelos por categorías en términos de tasas de implantación (TI), se observó que el 83,9 % de los embriones clasificados por ASEBIR se distribuyen entre las categorías B y D, pero no había diferencias estadísticamente significativas en la TI. Sólo el 16,1% de los embriones (el grupo “A”) tuvieron una TI mayor respecto al resto de categorías. Sin embargo, con el TLC el 70,7 % de los embriones tuvieron una TI mayor (estadísticamente significativo), comparable a la categoría “A” de ASEBIR.

### CONCLUSIONES

Estos datos comparan por primera vez el sistema de clasificación morfológica convencional elaborado por ASEBIR con un nuevo algoritmo de clasificación basado en la morfocinética, basándose en un tamaño muestral considerable.

La morfología, incluso en combinación con la división temprana, no es capaz de distinguir el potencial implantatorio de la mayor parte de los embriones. En este momento, teniendo en cuenta los criterios morfocinéticos conseguimos distinguir aquellos embriones que tienen mayor potencial implantación. Por consiguiente, la combinación de ambos sistemas nos permite mejorar la selección de los mejores embriones para transferir. Estamos llevando a cabo estudios prospectivos aleatorizados para confirmar los resultados aquí reflejados.



## P-021: MEJORA DE LA CALIDAD SEMINAL TRAS RECOGIDA DE LA PRIMERA FRACCIÓN DEL EYACULADO

M. Hebles, M. Dorado, M. González, L. Aguilera, B. Migueles, A. Fernández, M. Gallardo, F. Sánchez Martín, P. Sánchez Martín  
Ginemed Clínicas, Sevilla  
[mhebles@ginemed.es](mailto:mhebles@ginemed.es)

### INTRODUCCIÓN

El éxito de las Técnicas de Reproducción Asistida es la suma de muchas variables, siendo fundamental la calidad de los gametos.

Durante mucho tiempo hemos manejado el factor masculino en los términos que nos marcaba principalmente el seminograma.. Se pensaba que La existencia de espermatozoides móviles con aceptable morfología era suficiente para obtener buenos resultados en ICSI, pero ciclos fallidos de ICSI, no achacables a la calidad ovocitaria ni tampoco a los parámetros seminales tradicionales, nos llevaron a profundizar aún más en el factor masculino. Además de los parámetros del seminograma clásico, la fragmentación del DNA tiene una gran influencia en la calidad embrionaria. Valores elevados pueden provocar fallos repetidos de ICSI en muestras seminales aparentemente normales. La disminución de la fragmentación del DNA se puede lograr de manera significativa con la recogida del eyaculado en dos fracciones. La primera fracción del eyaculado (PFE) es rica en Zinc, que aporta un efecto estabilizador de la cromatina espermática impidiendo la descondensación prematura de la misma. La segunda fracción del eyaculado (SFE) contiene secreciones de la vesícula seminal, rica en proteínas, que disminuyen la disponibilidad del zinc, por lo tanto, se asumen que en la 1ª fracción del eyaculado debemos disponer de los espermatozoides con la cromatina mejor protegida y con menor fragmentación del ADN.

### OBJETIVO

El objetivo de nuestro estudio fue valorar si existían diferencias en la

calidad espermática en la PFE respecto a la SFE y comparado con el total del eyaculado (TE).

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se han estudiaron 30 pacientes que acudieron a la clínica para estudio de reproducción. Tras una abstinencia de 2 a 5 días, se le solicitó la recogida seminal en dos fracciones, la PFE compuesta por el primer impulso del eyaculado y la SFE compuesta por el resto del eyaculado. Con ambas fracciones se reconstituyó el TE. En las 3 muestras, PFE, SFE y TE, se estudiaron los parámetros seminales clásicos, así como el contenido de Zinc, Ac. Cítrico y fructosa. También se realizó el test de fragmentación del DNA, mediante la técnica SCD (Dispersión de la Cromatina Espermática), con el kit Halosperm.

### RESULTADOS

Observamos que en la primera fracción del eyaculado se recoge un volumen menor de semen (0.63 frente a 1.53 ml de media), una mayor concentración espermática (89.5 frente a 40 millones por ml), mayor motilidad (48.5 frente a 31.9 % a+b), mejor morfología (mayor número de formas normales según el criterio estricto de Kruger 4.9 frente a 3.4%) y menor tasa de fragmentación (17 frente a 32,3 %), con diferencias estadísticamente significativas.

### CONCLUSIONES

En la primera fracción del eyaculado observamos una mejora general en los parámetros seminales. Esto nos induce a pensar que la recogida de la muestra seminal en dos fracciones y el uso preferencial de la primera nos puede permitir obtener de antemano una población de espermatozoides de mejor calidad antes de utilizar

las técnicas posteriores de selección espermática como la centrifugación por gradientes de densidad y las columnas de anexina, con las que actúa de forma sinérgica para seleccionar la población de espermatozoides óptima para la ICSI.

## P-022: PATOLOGÍA FETAL Y NEONATAL DERIVADA DE TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

M.J. López <sup>1,7</sup>, I. Martínez <sup>1,7</sup>, M. Pampin <sup>1,7</sup>, F. Garrido <sup>1,2</sup>, G. Manzanera <sup>1,3</sup>, M.T. Castro <sup>1,4</sup>, P. Muñoz <sup>1,5</sup>, J. Peña <sup>1,6</sup>, J. Codesido <sup>1,7</sup>

<sup>1</sup> Asociación Nacional de Clínicas de Reproducción Asistida (ANACER)

<sup>2</sup> Centro Ginecológico de León (León)

<sup>3</sup> Centro Ginecológico Manzanera (Logroño)

<sup>4</sup> CIRH. Barcelona, 5 CREA Centro Médico de Reproducción asistida (Valencia)

<sup>5</sup> Instituto Ginecológico Elcano (Bilbao),

<sup>6</sup> IRAGA. Unidad de Reproducción Asistida La Rosaleda (Santiago de Compostela)

[mjlopezr@iraga.net](mailto:mjlopezr@iraga.net)

### INTRODUCCIÓN

El creciente número de niños nacidos tras técnicas de reproducción asistida hace que sea cada vez más importante el estudio de los posibles riesgos teniendo como principal objetivo un niño sano en casa. Los defectos en los fetos y recién nacidos son frecuentes debido a la complejidad en su desarrollo. Distintos autores consideran que entre un 3 y un 5 % de los recién nacidos tienen un defecto congénito.

En este trabajo se plantea es si la frecuencia de las anomalías en el desarrollo es diferente en recién nacidos concebidos de forma natural o de los obtenidos después de TRA

### OBJETIVOS

El objeto de estudio será determinar la prevalencia de malformaciones en recién nacidos cuya gestación sea consecuencia de una TRA: Inseminación Artificial (Conyugal o Donante), FIV-ICSI, FIV, ICSI. Donación de ovocitos y criotransferencias.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Con una plantilla de recogida de datos para cada paciente se registran los datos de cada feto o Recién nacido resultante del TRA de seis clínicas pertenecientes a ANACER

Los recién nacidos se clasifican en normales y con anomalía, y clasificamos las anomalías encontradas.

### RESULTADOS

Teniendo en cuenta que con las TRA el riesgo de embarazo múltiple es

mayor y que aumenta el número de partos prematuros, siendo los niños nacidos con bajo peso, creamos dos grupos: los embarazos únicos y los múltiples

También hemos analizado los resultados en función de la TRA utilizada.

En los embarazos únicos, tras TRA, de 1232 niños nacidos el 3,8% tienen malformaciones. Estos valores están dentro del rango del 3-5% en recién nacidos concebidos de forma natural.

En los embarazos múltiples de 641 niños nacidos tras TRA el 6 % tienen malformaciones.

Del total de niños nacidos tras TRA encontramos que el 4.6% tienen malformaciones.

Según el tipo de tratamiento podemos ordenar las TRA de mayor a menor porcentaje de niños nacidos malformados de la siguiente manera:

ICSI	
6,9%	
FIV-ICSI	4,4%
Ovodonación	4,4%
Criotransferencias	4,2%
FIV	4%
IAD	2,3%
IAC	0%

En los embarazos únicos las malformaciones más encontradas según la técnica son: FIV e ICSI, Cardiacas y Grandes Vasos. FIV-ICSI Oseas, Criotrasnferencias Cardiacas y Grandes Vasos y Oseas, Ovodonación Cerebrales.

En los Embarazos múltiples observamos que las anomalías en mayor porcentaje según la TRA son: FIV Cara y Cuello, Genitourinarias, Cordón. ICSI Cardiacas y Grandes Vasos y Tórax. FIV-ICSI Alteraciones cromosómicas, Ovodonación Cerebrales y Alteraciones cromosómicas.

### CONCLUSIONES

No encontramos más malformaciones en los niños nacidos de embarazos únicos tras tratamiento de reproducción asistida que en los niños concebidos de forma natural

Aunque en los niños nacidos de embarazos múltiples obtenemos un porcentaje mayor de malformaciones que el 3-5% calculado para los nacidos concebidos de forma natural, al sumar todos los niños nacidos tras TRA el porcentaje (4,6%) está dentro de este rango

Parece haber una tendencia a un mayor riesgo de malformaciones fetales asociada a las técnicas de reproducción asistida más complejas para poder confirmarlo seguimos recopilando datos de los centros de ANACER

No podemos asociar claramente ningún tipo de malformación a las distintas técnicas de reproducción aunque las más frecuentes son las cardiacas y de grandes vasos tanto para embarazos únicos como múltiples. Se observa un aumento de malformaciones en el tórax en los embarazos múltiples debido a la inmadurez pulmonar asociada a los partos prematuros.

## P-023: LOS EMBRIONES QUE ALCANZAN EL ESTADIO DE MÓRULA ANTES DE LAS 70 HORAS POST ICSI PRESENTAN MEJORES TASAS DE IMPLANTACIÓN

I. Rubio; A. Galán; J. Herrero; A. Tejera; JM. de los Santos y M. Meseguer  
IVI Valencia  
[irene.rubio@ivi.es](mailto:irene.rubio@ivi.es)

### INTRODUCCIÓN

La evaluación de los embriones humanos para la transferencia se basa en rasgos morfológicos y tasas de desarrollo que, independientemente de la clasificación utilizada, son subjetivos y dependen del observador. La introducción de la morfocinética embrionaria mediante tecnología time-lapse hace posible el uso de estos datos como criterio para seleccionar los embriones en función de sus parámetros cinéticos (tiempos exactos en los que las divisiones se producen) además de la morfología.

Tanto el modelo ASEBIR combinado con la división temprana, como el modelo TLC (time lapse categorization) propuesto por Meseguer en 2011, son capaces de clasificar la calidad embrionaria por categorías, pero el sistema más eficaz para clasificar y seleccionar los mejores embriones para transferir es la combinación de ambos.

### OBJETIVO

Evaluación de los resultados obtenidos en función del sistema usado para clasificar los embriones humanos: criterios morfológicos incluyendo la división temprana o morfología combinada con cinética.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo sobre un total de 1521 embriones transferidos de 946 primeros ciclos de ICSI realizados entre julio de 2009 y agosto de 2012 en IVI Valencia. Analizamos la selección embrionaria en base a resultados de implantación (cuando el número de sacos gestacionales coincide con el número de embriones transferidos): 432 embriones con 100% implantación y 1089 embriones sin implantación.

Los embriones transferidos fueron seleccionados de acuerdo a criterios morfocinéticos (teniendo en cuenta cinco categorías, de la A a la E), mediante un sistema time-lapse de vigilancia (Embryoscope™, Fertilitech, Dinamarca) y se han clasificado según ASEBIR incluyendo la división temprana (con cuatro categorías, de la A a la D). Las coincidencias en la categorización entre ambos modelos y las tasas de implantación fueron analizadas.

### RESULTADOS

Una vez clasificados por ASEBIR, la asignación entre los grupos fue heterogénea (52,6 % de los embriones fueron asignados al grupo "B"), mientras que la clasificación TLC entre los cinco grupos fue mucho más homogénea (31,3 % "A", 16,1 % "B", 23,3 % "C", 10,3 % "D" y el 19,0 % "E").

Al comparar ambos modelos por categorías en términos de tasas de implantación (TI), se observó que el 83,9 % de los embriones clasificados por ASEBIR se distribuyen entre las categorías B y D, pero no había diferencias estadísticamente significativas en la TI. Sólo el 16,1% de los embriones (el grupo "A") tuvieron una TI mayor respecto al resto de categorías. Sin embargo, con el TLC el 70,7 % de los embriones tuvieron una TI mayor (estadísticamente significativo), comparable a la categoría "A" de ASEBIR.

### CONCLUSIONES

Estos datos comparan por primera vez el sistema de clasificación morfológica convencional elaborado por ASEBIR con un nuevo algoritmo

de clasificación basado en la morfocinética, basándose en un tamaño muestral considerable. La morfología, incluso en combinación con la división temprana, no es capaz de distinguir el potencial implantatorio de la mayor parte de los embriones. En este momento, teniendo en cuenta los criterios morfocinéticos conseguimos distinguir aquellos embriones que tienen mayor potencial implantación. Por consiguiente, la combinación de ambos sistemas nos permite mejorar la selección de los mejores embriones para transferir. Estamos llevando a cabo estudios prospectivos aleatorizados para confirmar los resultados aquí reflejados.

## P-024: ASISTENTE VIRTUAL PARA LA PREDICCIÓN DE LOS PARÁMETROS SEMINALES A PARTIR DE FACTORES AMBIENTALES Y DEL ESTILO DE VIDA

J.L. Girela<sup>1,4</sup>; D. Gil<sup>2</sup>; D. Cortés<sup>3</sup>; J. De Juan<sup>1,4</sup>.

<sup>1</sup> Dpto. Biotecnología, Universidad de Alicante, Alicante. <sup>2</sup> Dpto. Tecnología Informática y Computación, Universidad de Alicante, Alicante.

<sup>3</sup> I-think.es, Alicante. <sup>4</sup> Cátedra de Medicina Reproductiva Universidad de Alicante-Instituto Bernabeu, Alicante.

[girela@ua.es](mailto:girela@ua.es)

### INTRODUCCIÓN

Las tasas de fecundidad han disminuido drásticamente en las últimas dos décadas, y este descenso ha coincidido con una aparente disminución en la calidad seminal de los varones. Existen numerosos trabajos que muestran como los factores ambientales, así como determinados hábitos de vida, pueden afectar a la calidad del semen, habiendo aumentado los problemas de fertilidad en los que es el factor masculino el que se encuentra alterado. Por otra parte, en los últimos años ha aumentado considerablemente el número de jóvenes que se interesan por participar en los programas de donación de semen de los diferentes centros dedicados a la medicina reproductiva, aunque con unas tasas de aceptación muy bajas debido a que muchos de ellos no llegan a cumplir los estándares establecidos para su inclusión. En este trabajo se utilizan técnicas de inteligencia artificial para predecir las características del semen a partir de los factores ambientales, hábitos de vida y estado de salud.

### OBJETIVO

El objetivo es desarrollar un sistema de apoyo a la decisión (*Decision Support System*) que pueda ayudar en el diagnóstico precoz y el estudio posterior de los varones con alteraciones seminales, así como en la selección de los candidatos a convertirse en donantes de semen.

### MATERIAL Y MÉTODOS

123 voluntarios proporcionaron una muestra de semen que se analizó de acuerdo con los criterios de la Organización Mundial de la Salud 2010. También se les pidió cumplimentar

un cuestionario validado sobre factores ambientales, hábitos de vida y estado de salud. La concentración de espermatozoides y el porcentaje de espermatozoides móviles fueron relacionados con datos socio-demográficos, factores ambientales, estado de salud y hábitos de vida, para determinar la exactitud en la predicción de un tipo de red neuronal artificial denominado *Multilayer Perceptron* (MLP). Dado que los parámetros usados en la predicción de los diferentes parámetros seminales no coincidían, decidimos desarrollar dos redes neuronales, una para la concentración espermática y otra para la motilidad. Tras la obtención de los algoritmos que permitían a la red neuronal predecir con una alta exactitud los parámetros seminales, se desarrolló una aplicación informática que permitiese una fácil toma de decisiones en base a los resultados obtenidos.

### RESULTADOS

En la selección de los factores para la clasificación de los sujetos se determinó que solo la edad debía aparecer en ambas redes neuronales. Para el desarrollo de la red neuronal capaz de predecir la concentración espermática junto a la edad se determinó que eran necesarios 8 factores: la estación, las enfermedades infantiles, los accidentes o traumatismos, las intervenciones quirúrgicas, los episodios febriles, la frecuencia de consumo de alcohol, el hábito de fumar y el número de horas sentado. Para la red neuronal que predecía la motilidad se seleccionaron junto a la edad otros 8 factores: el índice de masa corporal, el estado civil, número de hijos, vacunas recibidas, alergia, exposición a radiaciones, horas de sueño y baños calientes.

La red neuronal clasificó correctamente el 90% de los varones en base a su concentración espermática y al 82% en base a su motilidad.

### CONCLUSIONES

Hemos desarrollado una aplicación, denominada VIDA (Virtual Infertility Decision Assistant) accesible a través de la web "[dbt.ua.es/en/research/vida.html](http://dbt.ua.es/en/research/vida.html)", que puede predecir con una alta exactitud los resultados del análisis de semen, partiendo solo de los datos recogidos por el cuestionario. El parámetro seminal que mejor predijo el uso de esta metodología es la concentración de espermatozoides, siendo la precisión de la motilidad ligeramente inferior. Esta metodología puede ser una herramienta útil para el diagnóstico temprano de los pacientes con trastornos seminales o en la selección de los candidatos a convertirse en donantes de semen.

### AGRADECIMIENTOS

Trabajo parcialmente financiado por Vicerrectorado de Investigación, Universidad de Alicante (Vigrob-137).

## P-025: USO DE LA TECNOLOGÍA TIME-LAPSE EN LA EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO: EFECTO EN LA DENSIDAD DEL ACEITE

D. Gumbao, A. Sánchez-León, J. Marcos, B. Amorocho, M. Mollá, L. Fernández, M. Nicolás, J. Landeras  
IVI Murcia. Murcia  
[david.gumbao@ivi.es](mailto:david.gumbao@ivi.es)

### INTRODUCCIÓN

Las condiciones in vitro a las que sometemos nuestros embriones durante su cultivo pueden afectar a su desarrollo embrionario, incluyendo valores de cinética embrionaria difíciles de medir si no se cuenta con una mayor tecnología como es la del caso del cultivo embrionario con procesamiento de imagen del tipo time-lapse. Por otra parte, la calidad del aceite empleado en el cultivo embrionario resulta importante para un tratamiento de Fecundación in vitro exitoso. De hecho, diferencias en la calidad del aceite empleado pueden afectar de forma crítica al desarrollo embrionario.

### OBJETIVOS

En la realización de este estudio se plantearon dos objetivos: el primero de ellos fue observar si nuestro sistema de time-lapse resultaría útil para evaluar el efecto de las condiciones de cultivo en nuestros embriones; el segundo, evaluar si diferencias en la densidad del aceite empleado afectaría la calidad de nuestros embriones, su cinética y los resultados obtenidos.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Los embriones procedentes de 173 ciclos de ovodonación, realizados desde enero 2011 hasta abril 2013, fueron divididos en dos grupos y cultivados en Embryoscope® hasta el estadio de blastocisto empleando placas de cultivo de 12 pocillos con 25µL de medio y recubiertos con 1400µL de aceite mineral de mayor (LifeGuard®, LifeGlobal) y menor (LiteOil®, LifeGlobal) densidad.

Las diferencias estadísticas se analizaron mediante software estadístico (SPSS 15.0 Inc., Chicago, IL, USA) para  $p < 0.05$ .

Tabla 1. \* Diferencias estadísticamente significativas  $p < 0.05$

Resultados clínicos			
	Aceite alta densidad	Aceite baja densidad	P
Nº de tratamientos	59	114	
Nº de transferencias	57	108	
Edad	40.0	40.3	
Nº embriones transferidos	1.5	1.6	
Fecundación	77.6 % (485/625)	77.0 % (993/1290)	0.74
Embarazo clínico	66.7 % (38/57)	54.6 % (59/108)	0.13
Implantación	56.3 % (45/80)	43.5 % (77/177)	0.06
Bioquímicos	5.0 % (2/40)	18.1 % (13/72)	0.05
Aborto clínico	23.7 % (9/38)*	8.5 % (5/59)*	0.04
Time lapse			
Nº embriones	403	711	
División 2 células	26.7h	27.1h	0.17
División 3 células	37.8h	37.0	0.06
División 5 células	50.3h	50.8h	0.45
División 8 células	61.7h*	63.3h*	0.04

### RESULTADOS

Los resultados obtenidos evidenciaron tendencias no significativas a favor del grupo de embriones cultivados en aceite denso en cuanto a embarazo clínico por transfer (66.7% vs 54.6%  $p=0.13$ ), implantación (56.3% vs 43.5%  $p=0.06$ ) y aborto bioquímico (5.0% vs 18.1%  $p=0.05$ ). Por el contrario, los valores de aborto clínico si fueron significativamente menores en el grupo de aceite ligero (23.7% vs 8.5%  $p=0.04$ ), aunque en el seguimiento de las transferencias de embriones congelados de los casos de aborto clínico pertenecientes al grupo de aceite denso esta tasa quedo en el 16.7%. Por otro lado, pese a que la cinética time-lapse se encontró dentro de los rangos óptimos de implantación para ambos grupos, si se observó una tendencia de división más rápida para el grupo de aceite denso

especialmente en división temprana, siendo estadísticamente significativa en la división a ocho células (61.7 h vs 63.3 h  $p=0.04$ ).

### CONCLUSIONES

La tecnología time-lapse se presenta como una herramienta muy útil para evaluar el desarrollo embrionario en las diferentes condiciones de cultivo a las que podamos someter nuestros embriones. Además, en el caso del presente estudio nos ha permitido detectar diferencias entre embriones cultivados con aceite de diferente densidad. De esta manera, pese al incremento inicial en las tasas de aborto cuando usamos aceite más denso, el análisis posterior de las transferencias de los embriones congelados y los resultados obtenidos en fresco, nos hacen posicionarnos, a priori, a favor del uso del aceite más denso.



## P-026: IMPRECISIÓN EN HEMOCITÓMETROS EN EL PROGRAMA DE CONTROL DE CALIDAD EXTERNO DE SEMEN AUSPICIADO POR ASEBIR DURANTE LOS AÑOS 2000 A 2011

A. Yoldi; J.L. del Pico; L. Corpas; S. Zamora y A. Ladrón de Guevara.  
CEIFER. Centro de Estudios e Investigación de la Fertilidad. Granada.  
[alberto.yoldi@ceifer.com](mailto:alberto.yoldi@ceifer.com)

### INTRODUCCIÓN

Hoy día, el análisis de la concentración espermática sigue planteando discusiones: variabilidad, diversidad de cámaras de contaje espermático, etc.

Desde el año 1999 hasta la actualidad nuestro laboratorio ha organizado el Control de Calidad Externo para el Análisis de Semen auspiciado por ASEBIR en colaboración con la Asociación Española de Farmacéuticos Analistas (AEFA), la Asociación Española de Biopatología Médica (AEBM) y con el Grupo de interés en Andrología de la European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE).

### OBJETIVOS

Se pretende evaluar el grado de variabilidad que presentan las cámaras Makler y Neubauer Improved.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se aprovechan los datos aportados por el Control de Calidad Externo para el análisis de semen entre los años 2000 y 2011. Para el análisis de la concentración espermática, se mandan semestralmente dos alícuotas de 200  $\mu$ l. de semen (muestras A y B), fijadas con líquido Weigman,.

Se aplica el análisis de normalidad de Shapiro-Wilks, el test de varianzas de Levene y el test T de Student para comparación de medias apareadas. Finalmente, para evaluar el estudio de variabilidad entre cámaras, utilizamos el análisis de correlaciones, el coeficiente de variación (CV) y un gráfico Bland-Altman. El nivel de significación de las pruebas estadísticas es  $p < 0,05$ .

### RESULTADOS

El número de centros inscritos en el control de calidad tiende a aumentar con los años. En el 2011 han participado un total de 54 laboratorios. De ellos, el 65% utilizan cámara Makler y el 35% Neubauer improved.

No se observaron diferencias significativas entre la concentración media determinada por ambas cámaras. Sin embargo, el CV medio obtenido por la cámara Makler fue estadísticamente superior al de la Neubauer improved ( $p < 0,05$ ).

Al analizar las correlaciones entre el CV y la concentración espermática media de las dos cámaras, se observa una disminución estadísticamente significativa de sus correspondientes CV conforme aumenta la concentración espermática. ( $p < 0,01$ ).

En un gráfico Bland-Altman, podemos apreciar la diferencia entre los CV de Neubauer y Makler (eje de abcisas), enfrentada a la concentración media (eje de ordenadas). Se aprecia una mayor nube de puntos con valor negativo (lo que implica un mayor CV en la Makler). No se aprecia relación alguna con la concentración espermática.

En otro gráfico Bland-Altman, representamos la diferencia entre las concentraciones de Neubauer y Makler enfrentada con la concentración media. En este caso hay más puntos con valor positivo, lo que implica mayores estimaciones de la concentración espermática en la Neubauer. Por debajo de una concentración de 20 millones/ml, los puntos presentan una distribución muy simétrica en torno a la línea de referencia (0,0) del eje de abcisas, indicando estimaciones muy similares de ambas cámaras.

### CONCLUSIONES

Las concentraciones espermáticas medias obtenidas por las cámaras Makler y Neubauer no presentan diferencias estadísticamente significativas. Aunque ambas cámaras tienden a disminuir su variabilidad conforme aumenta la concentración espermática, el CV medio obtenido por la cámara Makler es estadísticamente superior al que presenta la Neubauer. Por esta razón, recomendamos el uso de la cámara Neubauer improved en el laboratorio de andrología, siendo necesario un estudio similar con mayor tamaño muestral y mayores concentraciones espermáticas.

## P-027: CORIFOLITROPINA ALFA (ELONVA) VS RFSH: RESULTADOS PRELIMINARES EN UN PROGRAMA DE DONACIÓN DE OOCITOS

J. Cuadros; M. Sánchez; M. Morales; L. Andrés; E. Ricciarelli; E. Hernández; J.L. Gómez Palomares  
 Centro de Medicina de la Reproducción y Ginecología FIVMadrid, Madrid  
[jcuadros@fivmadrid.es](mailto:jcuadros@fivmadrid.es)

### INTRODUCCIÓN

La Corifolitropina alfa (Elonva) presenta una ventaja importante respecto de la FSH recombinante (rFSH); una única inyección mantiene el desarrollo folicular durante 7 días, lo que representa una gran comodidad para las mujeres, hasta ahora sometidas a una inyección diaria para la estimulación ovárica.

### OBJETIVOS

En este estudio retrospectivo, comparamos los resultados obtenidos en la estimulación ovárica mediante Elonva vs rFSH en el programa de donación de oocitos.

### MATERIAL Y MÉTODOS

En el grupo de estudio, en 36 donantes se indujo la foliculogénesis con Elonva, y el

crecimiento folicular se mantuvo tras los 7 días con rFSH (Puregon). En el grupo control, se inició la foliculogénesis en 49 donantes con rFSH (225 IU/día) en un protocolo *step-down*. En ambos casos se administró diariamente un antagonista de la GnRH (0,25 mg de Ganirelix), y cuando los folículos superaron los 14 mm se administró hMG ultra pura hasta el final de la estimulación ovárica. La ovulación fue inducida con 0,2 mg de un agonista de la GnRH (Triptorelina). Las pacientes receptoras de los oocitos fueron preparadas con estradiol vía oral y progesterona por vía vaginal. El análisis estadístico se realizó mediante Chi-cuadrado.

### RESULTADOS

No se encontraron diferencias significativas entre el grupo estudio (Elonva) y el grupo control (rFSH) en la duración del ciclo, unidades de FSH,

número de oocitos obtenidos y proporción de oocitos en metafase II. No hubo casos de síndrome de hiperestimulación ovárica en ninguno de los grupos. 52 receptoras recibieron oocitos de las donantes estimuladas con Elonva y 65 recibieron oocitos de las donantes estimuladas con rFSH. No se observaron diferencias significativas entre el grupo de estudio y el grupo control en las tasas de fecundación (76,8% y 79,8% respectivamente), de embarazo clínico (56,8% y 51% respectivamente) o de abortos (27% y 20,6% respectivamente).

### CONCLUSIONES

El uso de Elonva muestra los mismos resultados que la rFSH tanto en las tasas de fecundación como en las tasas de embarazo clínico o de abortos, por lo tanto su uso puede ser recomendado para la estimulación ovárica en los ciclos de donación de oocitos.

## P-028: TECNOLOGÍA BACS-ON-BEADSTM APLICADA AL ESTUDIO CITOGÉNÉTICO DE RESTOS ABORTIVOS

A. Martínez <sup>1</sup>; I. Campos-Galindo <sup>1</sup>; S. García-Herrero <sup>1</sup>; R. Gimeno <sup>1</sup>; J.A. Martínez-Conejero <sup>1</sup>; G. Ayala <sup>1</sup>; C. Simón <sup>1,2</sup>; J. Ferro <sup>2</sup>; C. Rubio <sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup> IVIOMICS, Valencia, España.  
<sup>2</sup> Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI). Instituto Universitario IVI, Universidad de Valencia, INCLIVA, España.  
[asuncion.martinez@iviomics.com](mailto:asuncion.martinez@iviomics.com)

### INTRODUCCIÓN

El estudio citogenético clásico de los restos fetales, se ha llevado a cabo mediante el cultivo celular de los mismos. Con esta técnica, se ha descrito una incidencia de anomalías cromosómicas fetoplacentarias de aproximadamente el 50% en abortos espontáneos del primer trimestre. Sin embargo, la tasa de no crecimiento de estos cultivos oscila entre el 5 y el 42 %.

### OBJETIVOS

En este trabajo se presentan los resultados retrospectivos de los estudios moleculares realizados en restos fetales sin necesidad de cultivo celular mediante el kit *KaryoLite-BoBs™*. Adicionalmente, se ha evaluado la concordancia de resultados entre tejido embrionario y trofoblasto.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Entre marzo de 2011 y mayo de 2013 se procesaron 187 muestras de restos abortivos procedentes de 180 gestaciones detenidas durante el primer trimestre y obtenidos mediante biopsia dirigida tras histeroembrioscopia. En un subgrupo de 10 muestras se estudió tejido de origen embrionario y trofoblasto.

La tecnología de *BACs-on-Beads* utiliza sondas de ADN procedentes de Cromosomas Artificiales Bacterianos o BAC fijados en microesferas Luminex®. Basado en esta tecnología, el kit *KaryoLite-BoBs™*, permite descartar aneuploidías para los 24 cromosomas en restos abortivos. Las principales etapas del ensayo son: 1) obtención del ADN genómico, 2) marcaje del ADN muestra y los ADN de referencia (masculino y femenino) con nucleótidos biotinizados, 3) purificación del ADN marcado, 4) hibridación del ADN marcado y purificado con una mezcla BoBs, 5) tras una serie de lavados las microesferas se incuban con estreptavidina/ficoeritrina que se une al ADN biotinizado, y 6) las microesferas se lavan y se resuspenden de nuevo para realizar la medición mediante un sistema instrumental Luminex® 100/200™ con el software xPONENT® 3.1 y el software de análisis BoBsoft 2.0™. El protocolo en el laboratorio requiere unas 24-48 horas.

**RESULTADOS**

Los resultados se muestran en la tabla.

En el subgrupo en el que se estudió tejido de origen embrionario y trofoblasto, se observaron discrepancias fetoplacentarias en dos muestras. En

	Embarazos Espontáneos	Embarazos TRA ovocitos propios	Embarazos TRA ovocitos donados	TOTAL
Nº casos	29	129	29	187
Edad mujer ±SD	36,90±3,95	36,89±3,89	36,95±3,97	36,98±3,89
Edad gestacional ±SD	8,21±1,32	8,22±1,31	8,21±1,33	8,22±1,31
% Normales/total	62,06	45,73	89,65	55,03
Nº normales XX	9	27	16	52
Nº normales XY	9	32	10	51
% Anormales/total	37,93	54,26 <sup>a</sup>	10,34 <sup>b</sup>	44,91
% trisómicos/anormales	54,54	82,85	100,00	79,76
% monosómicos/anormales	18,18	12,85	0	13,09
% dobles trisómicos/anormales	9,09	2,85	0	3,57
% triples trisómicos/anormales	9,09	0	0	1,19
% triploides/anormales	9,09	0	0	1,19

<sup>ab</sup> p<0,0001 Fisher's exact test

una de ellas el embrión fue 47,XY,+4 y el trofoblasto fue 48,XY,+4, +21. En el otro caso el embrión fue 45,XX,-22 y el trofoblasto fue 46,XX.

**CONCLUSIONES**

KaryoLite-BoBs™ nos ha permitido la obtención de resultados en el 100% de los tejidos abortivos analizados. Esta técnica no requiere cultivo celular, lo que nos evita problemas de contaminación y nos proporciona

resultados en 48 horas. Se aprecia un elevado porcentaje de anomalías cromosómicas en las pérdidas gestacionales obtenidas tras TRA con ovocitos propios, y este porcentaje es significativamente superior al observado en el programa de donación de ovocitos. Puesto que se trata de una técnica basada en la cuantificación del ADN, se pueden infradiagnosticar mosaicismos de bajo grado, poliploidías y anomalías estructurales equilibradas.

**P-029: ESTUDIO PROSPECTIVO RANDOMIZADO SOBRE LA ECLOSIÓN ASISTIDA EN EMBRIONES DESVITRIFICADOS. RESULTADOS PRELIMINARES**

M. Esbert; M. Florensa; M. Riqueros; M. Martín; A. Ballesteros; G. Calderón  
 IVI-Barcelona, Barcelona.  
[margaesbert@gmail.com](mailto:margaesbert@gmail.com)

**INTRODUCCIÓN**

La eclosión asistida (EA) es una técnica que afina, desestabiliza o agujerea la zona pelúcida (ZP) con la idea de ayudar al embrión a escapar de ella y poder así, implantar. Aunque su utilización sigue siendo controvertida hoy en día, parece que los casos en los cuales podría ser

más beneficiosa sería en las pacientes con fallos repetidos de FIV, en ciclos donde los embriones presentan una ZP gruesa y en ciclos de transferencias de embriones descongelados. Para realizar la EA, entre otros métodos, se puede utilizar una versión acidificada de la solución Tyrodes y a través de pulsos de calor generados por láser.

**OBJETIVO**

El objetivo de este estudio prospectivo randomizado fue evaluar si había alguna mejora en los resultados clínicos cuando se practicó EA en embriones que habían sido vitrificados y desvitrificados para realizar la transferencia en un ciclo substituido.

**MATERIAL Y MÉTODOS**

En este estudio se incluyeron 186 ciclos de transferencia de embriones que habían sido vitrificados en día 3 de desarrollo utilizando medios kitazato y con cryotop como soporte. Las criotransferencias se realizaron en el periodo comprendido entre el 01/01/2011 y el 19/03/2013.

Una vez los embriones fueron desvitrificados se valoró la supervivencia celular. En el caso de que todas las células hubieran resultado intactas se procedía a la randomización del ciclo en tres grupos: No se realizaba la EA; Se realizaba la EA mediante la versión acidificada de la solución Tyrodes; Se realizaba la EA mediante láser infrarrojo de diodo (OCTAX Laser Shot™).

Una hora después de la desvitrificación se realizó la EA en los casos que la randomización así lo decidió. Todas las transferencias se realizaron el mismo día de la desvitrificación.

Los tres grupos eran comparables en cuanto a la edad materna y calidad embrionaria de los embriones transferidos.

	NO EA	EA TYRODES	EA LASER
<b>Nº CICLOS</b>	61	62	62
<b>Nº EMBRIONES TRANSFERIDOS (±DS)</b>	1,79 (±0,52)	1,75(±0,53)	1,76(±0,55)
<b>% GESTACIÓN CLÍNICA</b>	36,1 (22/61)	35,5 (22/62)	37,1 (23/62)
<b>% IMPLANTACION</b>	19,9	25,1	27,6
<b>% ABORTO</b>	18,2 (4/22)	13,6 (3/22)	13,0 (3/23)
<b>% GEST. MULTIPLE</b>	18,2 (4/22)	22,7 (5/22)	26,1 (6/23)

**RESULTADOS**

Un total de 331 embriones de 186 pacientes fueron desvitrificados resultando intactos. Un caso del grupo en el que no se realizaba EA tuvo que ser excluido del estudio, dado que en el momento que se iba a realizar la transferencia se observó líquido intracavitario y se procedió a la revitrificación de los embriones.

En total, el porcentaje de embarazo clínico, de implantación, de aborto y de gestación múltiple fue de 36,2%; 24,3%; 14,9% y 22,4% respectivamente.

En la tabla 1 se observan los resultados clínicos en función del grupo de estudio. Los 3 grupos obtuvieron resultados clínicos similares, sin hallar diferencias

estadísticamente significativas en ninguna de las variables analizadas (DS= Desviación estándar).

Todas las gestaciones múltiples fueron embarazos gemelares bicoriales biamnióticos.

**CONCLUSIONES**

Según estos resultados preliminares, realizar eclosión asistida a los embriones desvitrificados no aporta un beneficio en cuanto a resultados clínicos de las transferencias en ciclos substituidos. El estudio sigue en marcha hasta poder analizar una mayor población que nos permita decidir si es útil realizar rutinariamente la EA en los ciclos de transferencia de congelados con embriones desvitrificados.

## P-030: ¿ES EFICAZ ACUMULAR OVOCITOS EN EDAD MATERNA AVANZADA?

N. Prados <sup>1</sup>; M. Cruz <sup>2</sup>; A. Requena <sup>2</sup>; M. Fernández <sup>1</sup>; A. Cobo <sup>3</sup>

<sup>1</sup> IVI Sevilla, Sevilla; <sup>2</sup> IVI Madrid, Madrid; <sup>3</sup> IVI Valencia, Valencia

[nicolas.prados@ivi.es](mailto:nicolas.prados@ivi.es)

**INTRODUCCIÓN**

La introducción de la vitrificación ha supuesto un avance importante en la práctica de las técnicas de Reproducción Asistida, de modo que con los tratamientos de congelación es posible obtener tasas de gestación similares a las obtenidas en mujeres normo-respondedoras y en consecuencia, se evitan los efectos secundarios asociados a una edad materna avanzada (EMA).

**OBJETIVOS**

Comparar la eficacia de los ciclos de acumulación de ovocitos vitrificados frente a los protocolos estándar con ovocitos frescos en mujeres de edad materna avanzada (más de 40 años).

**MATERIAL Y MÉTODOS**

Estudio retrospectivo de cohortes en el que se analizaron 3384 ciclos comparando estrategias de trabajo

con ovocitos frescos (n=2531) frente a acumulación de ovocitos vitrificados (n=853) en mujeres ≥40 años. El período de estudio comprende desde Enero-2009 hasta Junio-2012. El análisis estadístico (Chi-cuadrado, regresión logística y lineal) se realizó con el software SPSS 19.0; se calcularon los odds-ratio con un intervalo de confianza al 95% (IC95%) y se establecieron los niveles de significación estadística en p<0.05.

## RESULTADOS

Se observa que los factores más significativos que afectan al éxito de un ciclo en EMA son la edad de la paciente y el número de ovocitos recuperados durante la aspiración folicular. Cada año por encima de 40 reduce significativamente la probabilidad de gestación (0.645, IC95% 0.583-0.714,  $p < 0.001$ ) y cada ovocito recuperado la aumenta significativamente (1.074, IC95% 1.052-1.097,  $p < 0.001$ ). La asociación entre gestación y número de ovocitos es más fuerte por encima

de 6 ovocitos, observándose cierta estacionalidad por encima de este valor.

La predicción de las tasas de gestación es similar para ovocitos frescos y ovocitos vitrificados acumulados (28.3% y 31.6%) respectivamente en una cohorte de 6 ovocitos, independientemente de número de estimulaciones necesarias para obtener esta cantidad; el riesgo proyectado de no tener transferencia es menor en las estrategias de acumulación (16%) que en cada intento individual (61%).

## CONCLUSIONES

La acumulación de ovocitos vitrificados beneficia a las mujeres de edad materna avanzada, ya que se obtienen tasas de gestación similares en comparación con una única estimulación, siendo 6 el número de ovocitos óptimo para maximizar los resultados clínicos. Nuestros resultados sugieren que acumular al menos 6 ovocitos es una alternativa válida en mujeres baja-responderas de más de 40 años.

# P-031: EL PATRÓN PRONUCLEAR NO PREDICE LA IMPLANTACIÓN. ESTUDIO RETROSPECTIVO EN DIFERENTES TIEMPOS DE OBSERVACIÓN

M. Pérez Fernández, E. Táboas, M. Ojeda, L. Suárez, E. Muñoz, J. Aguilar  
IVI Vigo, Vigo, Pontevedra.  
[maria.perez@ivi.es](mailto:maria.perez@ivi.es)

## INTRODUCCIÓN

La observación de los pronúcleos (PN) se emplea para valorar la correcta fecundación y también se ha aplicado como parámetro para la selección embrionaria. Los PN muestran un patrón dinámico de morfología que depende del momento en el que sean observados. Determinados estudios relacionan la evaluación pronuclear con la viabilidad del embrión y la presencia de anomalías cromosómicas.

Los nuevos sistemas de incubación con *time-lapse* permiten analizar en detalle la evolución del embrión.

## OBJETIVOS

El objetivo de este estudio es comparar el patrón pronuclear (*Z-score*) a las 17 horas post-inseminación (recomendación ASEBIR) y en el momento anterior a la desaparición de los PN, y relacionarlos con la tasa de implantación.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo de 2697 ovocitos microinyectados de 420 pacientes entre Enero de 2011 y Noviembre de 2012. Los

ovocitos microinyectados y embriones resultantes fueron incubados en incubador con tecnología *time-lapse*.

Para evaluar el efecto del *Z-score* en la tasa de implantación se aplicó un test  $\chi^2$  y un test  $\chi^2$  con una corrección de Yates.

Sólo se incluyeron en el estudio embriones con implantación conocida, definidos como KID (*Known Implantation Data*). Se consideraron embriones KID positivos (+) aquellos donde el número de sacos coincide con los embriones transferidos en un mismo tratamiento y KID negativos (-) aquellos donde no hubo implantación.

La distribución de los cuerpos precursores nucleolares (NPB) se clasificó en 4 grupos, siendo *Z-score* 1, 2, 3 y 4. *Z-score* 1 incluye los cigotos con 3 a 7 NPB polarizados, *Z-score* 2 los cigotos con NPB dispersos, *Z-score* 3 incluye los cigotos con una distribución de NPB no incluida en ninguno de los grupos anteriores y en *Z-score* 4 se incluyeron los cigotos con únicamente 1 ó 2 NPB.

El *Z-score* se determinó a las 17 horas post-inseminación (grupo A) y en el

momento anterior a la desaparición de los PN (grupo B).

La transferencia embrionaria se realizó en día 2-3 de desarrollo. Se confirmó la implantación mediante ecografía, detectando la presencia de sacos gestacionales.

## RESULTADOS

268 embriones KID fueron incluidos en el estudio, de los que el 33.5% (n=90) fueron KID (+) y el 66.5% (n=178) KID (-).

En la siguiente tabla se muestran la distribución de los embriones de acuerdo al *Z-score* y momento de observación y a su implantación.

Se observa un incremento de embriones con patrón *Z-score* 1 y 4 en el grupo B.

No se encontraron diferencias significativas al analizar el *Z-score* entre KID+ y KID- en el grupo A ( $p=0.28$ ) ni en el grupo B ( $p=0.245$ )

## CONCLUSIONES

Los pronúcleos muestran un patrón dinámico con variaciones en la



		Z-score 1	Z-score 2	Z-score 3	Z-score 4
Grupo A	KID (+)	10% (n=27)	7.8% (n=21)	15.6% (n=42)	0% (n=0)
	KID (-)	17.3% (n=46)	14.2% (n=38)	32.8% (n=88)	2.2% (n=6)
Grupo B	KID (+)	14.9% (n=40)	3.7% (n=10)	13.8% (n=37)	1.1% (n=3)
	KID (-)	23.13% (n=62)	7.5% (n=20)	30.9% (n=83)	4.8% (n=13)

**Tabla 1:** Distribución de embriones de acuerdo al Z-score y momento de observación.

clasificación del Z-score, dependiendo del momento en el que sean observados. Los NPB tienden a polarizarse y fusionarse al analizarse antes de la desaparición pronuclear.

Según los resultados obtenidos no se observa una relación entre la tasa de implantación y la valoración pronuclear a las 17 horas post-inseminación o en el momento antes de la desaparición de los PN.

Se necesitan más estudios con mayor casuística para poder confirmar estos resultados preliminares.

## P-032: LA TRANSFERENCIA DE UN ÚNICO BLASTOCISTO COMO ESTRATEGIA PARA EVITAR EL EMBARAZO GEMELAR EN UN PROGRAMA DE DONACIÓN DE OVOCITOS

M. Mollá, B. Amorocho, D. Gumbao, J. Marcos, A. Sánchez, M. Nicolás, L. Fernández, J. Landeras  
 IVI Murcia, Murcia  
[Marta.Molla@ivi.es](mailto:Marta.Molla@ivi.es)

### INTRODUCCIÓN

Actualmente, el embarazo gemelar es una de las complicaciones más importantes de los tratamientos de Reproducción Asistida. Los embarazos gemelares están asociados a un mayor riesgo de complicaciones maternas y perinatales como aborto, preeclampsia, hemorragia ante-partum, diabetes gestacional, cesáreas, prematuridad y discapacidad permanente en el recién nacido. Para reducir el número de embriones a transferir se puede realizar cultivo largo para la obtención de blastocistos permitiéndonos realizar una mejor selección embrionaria y, por tanto, disminuir la tasa de gestaciones múltiples. El objetivo del presente trabajo fue comparar los resultados clínicos cuando realizamos transferencia única de blastocisto frente a transferencias de dos blastocistos en un programa de donación de ovocitos.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo de 132 ciclos de ovodonación desde enero de 2012 a marzo de 2013. La técnica de Reproducción Asistida que se realizó fue FIV convencional

y/o ICSI según la calidad seminal. Todos los embriones se cultivaron hasta día 5 ó 6 en medio global® total® (LifeGlobal®) independientemente del número y calidad embrionaria. Se transfirieron 1 ó 2 blastocistos según antecedentes médicos de la paciente y deseo de la pareja aconsejando la transferencia única.

Las diferencias fueron analizadas estadísticamente mediante test de Fisher considerándose diferencias estadísticamente significativas con una  $p < 0.05$ .

### RESULTADOS

Los resultados clínicos se muestran en la siguiente tabla:

	TES 1	TES 2	p
N	66	66	
N transferencias	66	66	
Edad media	41,0	38,3	
Media ovocitos donados	11,5	12,0	
Tasa de gestación/transfer	66,67% (44/66)	75,75% (50/66)	0,34
Tasa de gestación clínica/transfer	57,57% (38/66)	68,18% (45/66)	0,28
Tasa de gestación bioquímica/transfer	13,63% (6/44)	10% (5/50)	0,75
Tasa de aborto clínico/transfer	18,42% (7/38)	20% (9/45)	1
Tasa de gestación gemelar/transfer	0	40%(18/45)	0,0001
Tasa de implantación	57,57% (38/66)	49,21% (63/128)	0,29

### CONCLUSIONES

Es importante concienciar a los pacientes que el embarazo múltiple conlleva unos riesgos obstétricos y neonatales que podemos evitar con la transferencia de un único blastocisto sin que se vean afectadas la tasas de gestación e implantación. Las pacientes que reciben ovocitos de donante son de buen pronóstico por lo que la realización del cultivo largo y la transferencia de un único blastocisto debería considerarse obligatoria en este tipo de pacientes.

## P-033: APLICACIÓN DE MDA EN PGD DE ENFERMEDADES MONOGENICAS

M.D. Lozano; R. Fernández; B. Sánchez; J. C. García Lozano; A. Peciña; J. Guardiola; J. L. Molini; S. Borrego; G. Antiñolo.  
UGC Genética, Reproducción y Medicina Fetal. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla.  
[maria.d.lozano.sspa@juntadeandalucia.es](mailto:maria.d.lozano.sspa@juntadeandalucia.es)

### INTRODUCCIÓN

La PCR multiplex fluorescente (amplificación de diferentes loci en una única reacción de PCR), se ha convertido en el estándar de oro para el Diagnóstico Genético Preimplantatorio (PGD) de enfermedades monogénicas, ya que permite realizar el análisis molecular directo e indirecto simultáneamente así como detectar de forma segura contaminaciones y fenómenos de ADO (allele drop out), todo ello en célula única, lo que implica la inversión de un gran esfuerzo para la optimización de los protocolos de PCR en cada caso.

Pero hay algunas situaciones, como en algunos casos complejos, en las grandes expansiones y deleciones o en las mutaciones autosómicas dominantes "de novo" donde esta metodología resulta insuficiente.

Estas situaciones se pueden solventar si disponemos de más ADN de partida, limitación fundamental del PGD. Para ello se utilizan técnicas de amplificación de genoma completo (WGA), como la técnica MDA (Múltiple Displacement Amplification).

### OBJETIVO

Analizar los resultados clínicos de los casos realizados en nuestra unidad con la aplicación de la técnica MDA para amplificación de genoma completo.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Desde Noviembre de 2011 hasta la actualidad, hemos realizado 12 ciclos a 10 pacientes. Las indicaciones han sido: un caso de Fibrosis Quística (FQ), dos de Síndrome X-frágil (X-frágil), uno de Hemofilia A (HA); un caso "de novo" de Poliposis adenomatosa familiar de colon (PAF); un caso de Enfermedad de

Machado-Joseph (SCA3); 4 casos de PGD en combinación con la determinación de antígenos HLA (PGD-HLA).

En cada ciclo de PGD se ha realizado biopsia embrionaria en d+3 de desarrollo y se ha extraído una sola célula de cada embrión. La amplificación de genoma completo de cada célula se ha realizado empleando un kit de MDA (illustra™ Genomiphi™ V2 DNA Amplification Kit (GE Health Care)). Posteriormente se ha realizado PCR múltiple fluorescente, y en el caso "de novo" además secuenciación.

### RESULTADOS

De los 12 ciclos se han biopsiado un total de 86 embriones. De las 86 blastómeras se ha obtenido diagnóstico en 84 (97.6%), siendo la tasa de ADO < 5%. De los 12 ciclos han tenido transferencia 7 (media: 1.7 embriones transferidos). Hemos obtenido 3 gestaciones clínicas (HA, X-frágil, FQ). Dos han terminado en parto (uno único y el otro doble) y la tercera es una gestación única en el 1º trimestre de embarazo. No se han encontrado discordancias entre el diagnóstico genético preimplantatorio y el diagnóstico postnatal de los 3 niños nacidos.

### CONCLUSIONES

Con la aplicación de la técnica MDA se obtiene de forma eficiente gran cantidad de ADN a partir del material genómico de partida de una blastómera, lo que aporta importantes ventajas. En primer lugar permite aplicar a posteriori una amplia variedad de técnicas, ampliando las posibilidades de realizar PGD en un mayor número de familias. Además permite analizar un alto número de loci aumentando la fiabilidad del diagnóstico genético. Al disponer de mayor cantidad de muestra también se

puede realizar análisis de alteraciones cromosómicas de todo el complemento, sin necesidad de extraer una segunda célula. Y en caso necesario se pueden realizar repeticiones evitando las rebiopsias.

## P-034: ESTUDIO DE ANOMALÍAS MEIÓTICAS Y ANEUPLOIDÍAS EN VARONES INFÉRTILES CON AZOOSPERMIA SECRETORA

V. Peinado <sup>1</sup>; N. Al-Asmar <sup>1</sup>; L. Alegre <sup>2</sup>; M. Vera <sup>1</sup>; L. Rodrigo <sup>1,2</sup>; M. Gil-Salom <sup>2</sup>; J.M. Martínez <sup>2</sup>; A. Pellicer <sup>2</sup>; J. Remohí <sup>2</sup>; C. Rubio <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>IVIOMICS, Valencia, España.

<sup>2</sup>Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI). Instituto Universitario IVI, Universidad de Valencia, INCLIVA, España.

[Vanessa.Peinado@iviomics.com](mailto:Vanessa.Peinado@iviomics.com)

### INTRODUCCIÓN

Existen dos eventos críticos en la profase I de la meiosis: en primer lugar, la sinapsis entre cromosomas homólogos y la formación del complejo sinaptonémico (CS), que regula la cohesión entre cromátidas hermanas y proporciona una localización favorable para anclar la maquinaria proteica de la recombinación. Y en segundo lugar, la recombinación entre cromosomas homólogos, que es esencial para que se produzca la correcta segregación de los cromosomas durante la meiosis. Errores en estos procesos pueden dar lugar a aneuploidías en espermatozoides.

### OBJETIVO

Evaluar la frecuencia de recombinación meiótica en espermatoцитos primarios y la incidencia de aneuploidías en espermatozoides, en una población de varones infértiles con azoospermia secretora de origen idiopático. Los resultados obtenidos se compararon con un grupo control de varones fértiles con azoospermia obstructiva post-vasectomía.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se llevó a cabo un estudio prospectivo de cohortes, desde enero de 2008 hasta diciembre de 2012, realizando una selección controlada de pacientes azoospermicos que se distribuyeron en dos grupos en función del tipo de azoospermia. Se incluyeron 18 pacientes con azoospermia secretora de origen idiopático (AS), 5 de los cuales, inicialmente fueron criptoospermicos, constituyendo el grupo de estudio y 18 pacientes con azoospermia obstructiva post-vasectomía (AO) formando el grupo control. En ambos grupos se analizó: la progresión meiótica, la longitud total del complejo

sinaptonémico (CS), y la frecuencia de recombinación en células meióticas en estadio de paquitene mediante inmunocitogenética, utilizando anticuerpos monoclonales frente a SCP3, MLH1 y CREST. Posteriormente se aplicó la técnica de Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH) con sondas dirigidas a regiones específicas de los cromosomas 13, 16, 18, 21 y 22 para identificar los bivalentes. Por otro lado, se analizó la incidencia de aneuploidías para los cromosomas 13, 18, 21, X e Y en espermatozoides procedentes de testículo, mediante FISH. Para medir la longitud del CS se utilizó el programa informático MicroMeasure.

### RESULTADOS

Los resultados ponen de manifiesto una disminución, estadísticamente significativa, de la frecuencia de recombinación meiótica en el grupo de pacientes con AS comparado con el grupo control (45,2 vs. 48,7;  $p < 0,0001$ ). En el grupo de pacientes con AS que inicialmente eran criptoospermicos, no se observó esta disminución significativa (49,1 vs. 48,7;  $p = 0,3763$ ). Se compararon los niveles de recombinación específica por cromosoma del grupo de AS y el grupo control, observándose en el grupo de AS una disminución de la frecuencia de recombinación para el cromosoma 16 (1,7 vs. 2,0;  $p < 0,0001$ ), para el cromosoma 18 (1,8 vs. 2,59;  $p < 0,0001$ ) y para el cromosoma 22 (1,04 vs. 1,15;  $p = 0,0394$ ). En cuanto a la medición de la longitud total de los CS, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (276,81  $\mu\text{m}$  azoospermias secretoras vs 276,67  $\mu\text{m}$  en el grupo control;  $p = 0,9526$ ). Los resultados obtenidos en el grupo de pacientes con AS mostraron un incremento estadísticamente significativo en la incidencia de

aneuploidías en sus espermatozoides comparados con el grupo control (0,38 vs. 0,18;  $p < 0,0001$ ). Al analizar la incidencia de anomalías cromosómicas en espermatozoides en el grupo de pacientes que presentaban inicialmente criptoospermia, y compararla con el grupo control no observamos diferencias estadísticamente significativas (0,21 vs. 0,18;  $p = 0,5044$ ).

### CONCLUSIONES

Nuestro estudio muestra una disminución en los niveles de recombinación y un incremento en la incidencia de aneuploidías en espermatozoides procedentes de testículo en pacientes con azoospermia secretora. Estos resultados corroboran la correlación entre ambos parámetros, así como un incremento del riesgo de aneuploidías para la descendencia de pacientes con azoospermia secretora.

## P-035: ¿INFLUYEN LOS MEDIOS DE CULTIVO EMBRIONARIO EN LOS RESULTADOS PERINATALES?

B. Carrasco<sup>1</sup>, M. Boada<sup>1</sup>, I. Rodríguez<sup>1</sup>, B. Coroleu<sup>1</sup>, P. N. Barri<sup>1</sup>, A. Veiga<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Obstetricia, Ginecología y Reproducción. Institut Universitari Quirón Dexeus. Barcelona.

<sup>2</sup>Banc de Línees Cel.lulars. Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona CMR[B], Barcelona.

[beacar@dexeus.com](mailto:beacar@dexeus.com)

### INTRODUCCIÓN

Las condiciones de cultivo in vitro son determinantes para la viabilidad embrionaria. Un cultivo embrionario en condiciones subóptimas puede afectar directamente al embrión preimplantacional, pero también puede que el impacto no sea evidente hasta etapas posteriores del desarrollo embrionario o incluso hasta la fase fetal.

Estudios publicados recientemente muestran una relación entre el medio de cultivo utilizado durante el desarrollo embrionario in vitro y el peso de los neonatos tras técnicas de reproducción asistida (TRA) (Dumoulin et al., 2010; Nelissen et al., 2012), aunque otros autores no encuentran relación alguna (Eaton et al., 2012; Vergouw et al., 2012).

### OBJETIVO

Determinar si el medio utilizado para el cultivo de embriones in vitro influye en el peso de los neonatos tras un tratamiento de FIV/ICSI.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Análisis retrospectivo del peso de los neonatos tras FIV/ICSI comparando los resultados según el medio de cultivo utilizado: Cook® (Brisbane, Australia), MediCult® (Jyllinge, Denmark) y Vitrolife® (Göteborg, Sweden). Se incluyeron 2518 ciclos de FIV/ICSI con ovocitos propios que tuvieron lugar en el Institut Universitari Quirón Dexeus, durante el periodo de octubre-2006 a diciembre-2010. Los ciclos de donación de ovocitos y diagnóstico genético preimplantacional fueron excluidos. Únicamente los ciclos que resultaron en un nacido vivo único fueron incluidos en el estudio.

Para comparar el peso de los neonatos obtenidos en los diferentes medios de cultivo, los pesos fueron transformados en una puntuación estandarizada o "z-score". Cada valor "z" corresponde al peso del recién nacido menos el peso esperado a esa edad gestacional y ese género, según una población de referencia y dividido por su desviación típica. Si la distribución de z-score, presentaban una media de cero y desviación típica de uno, podíamos asumir que se ajustan a la población de referencia y concluir que pesaban lo esperado.

### RESULTADOS

De los 2518 ciclos de FIV/ICSI analizados, 754 ciclos se incluyeron en el grupo Cook®, 821 en MediCult® y 943 en Vitrolife®. Un total de 898 embarazos fueron obtenidos (281 Cook®, 295 MediCult® y 322 Vitrolife®). De estos, se analizaron únicamente los 690 embarazos únicos: 209 Cook®, 235 MediCult® y 246 Vitrolife® que dieron lugar a 154 nacidos vivos en el grupo Cook®, 172 en MediCult® y 197 en Vitrolife®.

No se observaron diferencias entre los grupos con respecto a las características de las pacientes y los resultados tras el ciclo de FIV. El peso medio de los neonatos fue de 3127,9gr. en el grupo Cook®, 3155,82 gr. en MediCult® y 3105,6 gr. en Vitrolife®. El porcentaje de nacidos con bajo peso para la edad gestacional (<10th percentile) y el de partos a término ( $\geq 37$  semanas), no difirió significativamente entre los distintos grupos. La media de los valores z-score de los neonatos fue: Cook®  $-0.14 \pm 0.96$ ; MediCult®  $0.06 \pm 1.13$  y Vitrolife®  $0.03 \pm 1.05$ . Sin diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.687$ ).

La media de z-score para toda la población analizada, fue  $-0.07 + 1.05$  (CI95% [-0.09 – 0.08]). El peso de los recién nacidos tras TRA se ajustó a la distribución de pesos de la población general.

### CONCLUSION

En el presente estudio, no encontramos relación entre el medio de cultivo utilizado para el cultivo in vitro de los embriones y el peso de los neonatos tras TRA. Los valores obtenidos tampoco difieren de los referenciados para la población general.

Aunque estos resultados proporcionan cierta seguridad, estudios aleatorizados con muestras de mayor tamaño deberían realizarse con el propósito de aclarar si las TRA y en concreto el medio de cultivo, tiene alguna influencia en los resultados perinatales y en el posterior desarrollo de los recién nacidos.

## P-036: EFICIENCIA DEL ÁCIDO HIALURÓNICO EN LA SELECCIÓN ESPERMÁTICA

E.M. Martín, M.F. Fernández, R. Cueto, M. García, C. Monedero, E. Pérez de la Blanca  
Unidad Reproducción Asistida, Hospital Quirón Málaga  
[emartin.mlg@quiron.es](mailto:emartin.mlg@quiron.es)

### OBJETIVO

Para alcanzar un mayor éxito en las técnicas de reproducción asistida es necesario utilizar toda la metodología a nuestro alcance para seleccionar el mejor espermatozoide. En un ciclo de ICSI-ET la selección espermática se realiza en función de la movilidad y morfología del espermatozoide. El uso del ácido hialurónico (HA) como método adicional en la selección del espermatozoide previo a la ICSI puede mejorar los resultados de este tipo de tratamiento. El objetivo de este estudio es analizar los resultados de la introducción del ácido hialurónico en el programa de ICSI-ET de nuestro laboratorio.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio retrospectivo comparativo entre los medios de

hialuronato (SpermSlow, Medicult) y polivinilpirrolidona (SAGE) en la selección espermática para pacientes sometidas a ICSI-ET durante el año 2012 y 2013. Se estudiaron 101 parejas, 71 con PVP-ICSI y 30 con HA-ICSI. Teniendo pacientes de similar edad, diagnóstico, número de ovocitos recuperados y metafases II, se analizaron número de ovocitos fecundados, calidad embrionaria, tasa de implantación y embarazo.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El número de ovocitos fecundados ( $6 \pm 3$ DS PVP VS  $4 \pm 2$ DS HA), el número de embriones de buena calidad según la clasificación de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción ( $3 \pm 2$ DS PVP VS  $2 \pm 2$ DS HA) y la tasa de implantación ( $0,34 \pm 0,4$ DS PVP VS  $0,21 \pm 0,3$ DS HA), fueron similares en ambos grupos. En

cuanto al embarazo, se obtuvo una tasa de test positivo a los 14 días de la punción similar en el grupo del ácido hialurónico y del control (57% 17n VS 57% 52n) e inferiores en cuanto al embarazo clínico en el grupo del ácido hialurónico (40% 12n VS 54% 49n) sin que llegasen a ser diferencias significativas ( $p=0,21$ ).

### CONCLUSIONES

A la vista de nuestros resultados preliminares parece que la afinidad de los espermatozoides por el ácido hialurónico a la hora de la selección espermática no mejora los resultados en cuanto a tasa de embarazo e incluso parece que existe una tendencia a disminuirla. Teniendo en cuenta la diferencia en el número de pacientes entre ambos grupos creemos que sería necesario aumentar la potencia del estudio para confirmar los resultados.

## P-037: ESTUDIO DE BENCHMARKING: ESTUDIO MULTICÉNTRICO. ANACER

F. Marina<sup>9</sup>, B. Sendón<sup>1</sup>, MJ: López-Rubira<sup>2</sup>, C. García-Ochoa<sup>3</sup>, C. Puyo<sup>4</sup>, E. Suárez<sup>5</sup>, Eva Carretero<sup>6</sup>, D. García<sup>7</sup>, E. del Rio<sup>8</sup>, M. Ferrer<sup>10</sup>, JM. Moreno<sup>11</sup>, P. González<sup>12</sup>, E. Palacios<sup>13</sup>, B. Darder<sup>14</sup>, S. Rodriguez<sup>15</sup>.

Comité de Calidad de ANACER (Asociación Nacional De Clínicas De Reproducción Asistida), <sup>1</sup>Centro Médico Pintado, <sup>2</sup>IRAGA, <sup>3</sup>CEFIVA, <sup>4</sup>ELCANO, <sup>5</sup>Centro Ginecológico de León, <sup>6</sup>Clínica AISA, <sup>7</sup>Centro Ginecológico Manzanera, <sup>8</sup>CIRH, <sup>9</sup>Centro de Reproducción CEFER, <sup>10</sup>Centro de Reproducción CREA, <sup>11</sup>UR VISTAHERMOSA, <sup>12</sup>Clínica Inmaculada, <sup>13</sup>IERA, <sup>14</sup>CEFIBVA, <sup>15</sup>ICI  
[fernando@institutocefer.com](mailto:fernando@institutocefer.com)

### INTRODUCCIÓN

Los estudios de intercomparación de resultados entre laboratorios son una herramienta de detección de oportunidades de mejora de la competencia técnica en el Laboratorio, y en definitiva de la calidad asistencial. Su utilidad

está reconocida internacionalmente por Entidades de Acreditación (ISO, ENAC, ILAC, etc). Anacer estableció en 2011 un estudio multicéntrico anual, llamado Benchmarking Anacer, en el cual la intercomparación de sus laboratorios de FIV se basa en el contraste de indicadores de la Calidad.

### OBJETIVOS

El objetivo intervencional del Benchmarking Anacer fue detectar oportunidades de mejora, tanto a nivel de Asociación como a nivel de Centro, identificando rendimientos anormales en fases pre-analítica y analítica, por



contraste intragrupo e intergrupo con las recomendaciones de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR). La Asociación y Centros pueden en consecuencia adoptar medidas correctivas y preventivas en sus planificaciones estratégicas.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio observacional y exploratorio recoge todos los Centros del Grupo de Benchmarking de Anacer, sin exclusión, pertenecientes a diversas provincias y comunidades autónomas (15 centros). Los datos, de ciclos de fertilidad iniciados en 2011, se recogieron entre noviembre de 2012 y abril de 2013 por una consultora independiente.

Dado que el estudio intercompara indicadores de variables dicotómicas (embarazo/no embarazo, embrión útil/embrión no útil, etc.), las cuales tienen distribuciones binomiales, se optó por establecer la media y tres desviaciones típicas como el estándar de referencia intragrupo a partir de los Centros que hubiesen realizado más de 30 ciclos de fertilidad para cada variable estudiada, y poder usar métodos de distribuciones normales.

El estándar de referencia externo utilizado fueron las Fichas de Indicadores de Calidad 2012 del Grupo de Interés de Calidad en el Laboratorio de Reproducción Asistida de ASEBIR. Se optó por una inspección al 100% de los ciclos de infertilidad de los Centros en lugar de inspección por muestreo, dado que los sistemas de Información del Laboratorio lo permiten con sencillez y economía.

Cada centro aportó independientemente y con confidencialidad sus resultados de los ciclos iniciados en 2011 para las variables: tasas de Embarazo Clínico para Inseminación Artificial con semen de Cónyuge, y con semen de Donante, Embarazo Clínico en ciclos por transferencia en FIV y en ROD (Recepción de Óvulos Donados), tasas de Fecundación en FIV y en ICSI, tasas de Embriones Útiles en FIV y ROD, ratios de Implantación Embrionaria en FIV y ROD, tasas de Supervivencia en TEC-FIV y TEC-ROD.

#### RESULTADOS

Por contraste con los estándares ASEBIR 2012, todas las medias de los indicadores de la Calidad de los Centros Anacer satisfacen los valores

deseable u óptimo aconsejados, y la variabilidad entre Centros distintos se ciernen a los valores mínimo y óptimo, excediéndose éste en muchos casos. Tenemos así entre otros indicadores, los de Embarazo Clínico: para IAC 17,4% sobre deseable ASEBIR 17%; para IAD 18,6% sobre 17%; por transferencia FIV 39,1% sobre 34%; en ROD 44,5% sobre 45%; en TEC-FIV 36,5% sobre 20%; en TEC-ROD 30,5% sobre 23%.

Por intercomparación intragrupal, los Centros cuyos resultados distan dos desviaciones típicas de la media del grupo pudieron iniciar procesos de vigilancia, y los que excedían tres desviaciones típicas debían iniciar investigación destinada a tomar (si deficiencia) o aconsejar (si excelencia) medidas preventivas y correctivas en factores de la competencia técnica vinculados al indicador.

#### CONCLUSIONES

El Benchmarking Anacer ha sido una herramienta útil para la detección de oportunidades de mejora continua que puedan orientar investigaciones posteriores sobre las causas raíz de los rendimientos anormales.

## P-038: CUÁNDO REALIZAR FISHE

M. Lierta Sancho; C. Roméu; A. Chueca; C. De Bonrostro; I. Giménez; A. Urries.  
Reproducción Asistida Hospital Quirón Zaragoza, Grupo Hospitalario Quirón. Zaragoza.  
[mlierta.zar@quiron.es](mailto:mlierta.zar@quiron.es)

#### INTRODUCCIÓN

La infertilidad masculina y las anomalías cromosómicas están estrechamente relacionadas. Se ha podido observar gracias a la hibridación in situ fluorescente (FISH) que un elevado porcentaje de parejas que consultan por problemas de esterilidad presentan una dotación cromosómica incorrecta en los gametos masculinos.

#### OBJETIVO

Establecer cuáles son las indicaciones que tiene que presentar un paciente

para determinar la realización de un FISH en espermatozoides como prueba complementaria de rutina.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo realizado sobre 147 pacientes. El análisis se llevó a cabo en varones con una edad media  $37,7 \pm 4,8$  años y con cariotipo normal (46, XY). Para cada muestra se determinó la incidencia de disomías y diploidías para los cromosomas X, Y, 13, 18 y 21, así como la proporción de espermatozoides portadores del cromosoma X e Y. Para ello se realizaron dos hibridaciones

sobre dos portaobjetos diferentes utilizando las siguientes combinaciones de sondas: Kit FISH Diagnóstico Aneuploidías (Genycell-Biotech): CEP18 - Sonda satélite del cromosoma 18 en Aqua; CEPX - Sonda satélite del cromosoma X en Verde; CEPY - Sonda satélite del cromosoma Y en rojo. Mix Prenatal Cromosomas 13/21: 13q14.2 - Sonda Locus Único cromosoma 13 en Verde; 21q22.13 - Sonda Locus Único cromosoma 21 en Rojo. Las indicaciones para realizar FISHe fueron: I. Presentar un Factor masculino severo ( $REM \leq 1$  mill/ml). II. Factor masculino ligero ( $REM 2-15$  mill/ml). III. Abortos de repetición

de etiología desconocida ( $\geq 2$ ). IV. Fallos de implantación en ciclos de fecundación in vitro ( $\geq 2$ ). V. Esterilidad de origen desconocido. (Tabla 1). Por otra parte, se comparó la calidad seminal y las indicaciones para realizar FISHe: I. REM  $\leq 1$  mill/ml. II. REM: 2-5 mill/ml. III. REM: 6-19 mill/ml. IV. REM  $> 15$  mill/ml. (Tabla 2). El estudio estadístico se realizó utilizando el software SPSS.

## RESULTADOS

## CONCLUSIONES

No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos FMS, FML, ARY FI, únicamente se hallaron entre el grupo de FMS vs. EOD ( $p < 0,05$ ). Dentro de la calidad seminal se encuentran diferencias significativas entre los grupos REM  $\leq 1$  mill/ml vs. REM 2-5 mill/ml ( $p < 0,005$ ) y REM 2-5 mill/ml vs. REM 6-15 mill/ml ( $p < 0,05$ ). Según los resultados obtenidos se

debería realizar FISHe en Factor masculino severo y se recomendaría en abortos de repetición y fallos de implantación, teniendo en cuenta que en estos casos hay una responsabilidad compartida entre el gameto femenino y el masculino.

Indicación	nº de Pac. estudiados	nº de Pac. con FISHe (A)
F. masculino severo (FMS)	41 (27,9%)	30 (73,2%) <sup>a</sup>
F. masculino ligero (FML)	24 (16,3%)	14 (58,3%)
Abortos de repetición (AR)	42 (28,6%)	23 (54,8%)
Fallos de implantación (FI)	26 (17,7%)	14 (53,8%)
Esterilidad de origen desconocido (EOD)	14 (9,5%)	6 (42,8%) <sup>a</sup>

Tabla 1. Resultados de FISHe según indicación.

REM (mill/ml)	nº de Pac. estudiados	nº de Pac. con FISHe (A)	Ind.	%Anom./Ind.
REM $\leq 1$ mill/ml	41 (27,9%)	30 (73,2%) <sup>bb</sup>	FMS	30 (73,2%)
REM 2-5 mill/ml	33 (22,5%)	13 (39,4%) <sup>bb,c</sup>	FML	8 (24,2%)
			FML+AR	3 (9,1%)
			FML+FI	2 (6,1%)
REM 6-15 mill/ml	27 (18,4%)	19 (70,4%) <sup>c</sup>	FML	6 (22,2%)
			FML+AR	9 (33,3%)
			FML+FI	4 (14,8%)
REM $> 15$ mill/ml	46 (31,3%)	25 (54,3%)	AR	11 (23,9%)
			FI	8 (17,4%)
			EOD	6 (13,1%)

Tabla 2. Resultados de FISHe según calidad seminal.

## P-039: LOS PROSTASOMAS POSEEN UN EFECTO INMUNOMODULADOR SOBRE LAS CÉLULAS NK QUE PODRÍA ESTAR ASOCIADO A LA SUPERVIVENCIA ESPERMÁTICA EN EL TRACTO GENITAL FEMENINO

E. Delgado<sup>1</sup>, R. Tarazona<sup>2</sup>, MC. Guarnizo<sup>1</sup>, RG Roncero<sup>1</sup>, S. Morgado<sup>1</sup>, B. Sánchez-Correa<sup>2</sup>, J.J. Gordillo<sup>2</sup>, J. De Julián<sup>1</sup>, JG. Casado<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Norba, Ginecología y Reproducción S.L., Cáceres, España, <sup>2</sup> Universidad de Extremadura, Unidad de Inmunología, Cáceres España, <sup>3</sup> Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, Cáceres España.

[elenadelnie@clinicatorba.com](mailto:elenadelnie@clinicatorba.com)

### INTRODUCCIÓN

Los prostasomas son pequeñas vesículas secretadas por la glándula prostática al líquido seminal que se fusionan con los espermatozoides

transfiriéndoles iones, lípidos y proteínas de superficie que mejoran su movilidad, licuefacción y capacitación. Esta fusión, que se produce por el descenso de pH en la vagina, protege al espermatozoide de las defensas

inmunitarias en el tracto genital femenino.

Las células NK son la principal población de leucocitos en el tracto genital femenino y juegan un papel importante

en la defensa inmunológica pudiendo estar involucradas en la respuesta inmune innata frente a potenciales patógenos así como en la angiogénesis y el desarrollo de la placenta.

#### OBJETIVO

El objetivo de este trabajo ha sido analizar el papel de los prostasomas en la regulación de la actividad celular de las células NKs.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Los prostasomas de pacientes normozoospermicos (seleccionados según los criterios de la OMS) se aislaron por ultracentrifugación seguido de cromatografía FPLC en columna de Sephadex G-200. Las microvesículas se analizaron fenotípicamente por citometría de flujo después del acoplamiento con

microsféricas de carboxilato (polybead carboxylate®). Los experimentos *in vitro* se realizaron cultivando células NK purificadas mediante "sorting" eleccionando las células con el fenotipo CD3neg/CD56pos. Estas células se cultivaron con diferentes concentraciones de prostasomas a distintos tiempos. Las células NK se analizaron por citometría multiparamétrica y se emplearon para los ensayos funcionales de degranulación y producción de interferón gamma.

#### RESULTADOS

Nuestros resultados demuestran la expresión de diversos ligandos para receptores activadores de células NK en la superficie de los prostasomas, entre los que destaca el CD48. Los ensayos *in vitro* demuestran que la incubación de células NK con prostasomas

disminuyen los niveles de CD244 (ligando de CD48) de manera dosis y tiempo dependiente. Además, los estudios de degranulación y producción de interferón gamma demostraron que los prostasomas reducen la actividad citotóxica y secretora de células NK.

#### CONCLUSIONES

- La interacción entre CD244 en células NK y CD48 en los prostasomas provoca la disminución de CD244 reduciendo la activación de células NK.
- Los resultados apoyan la hipótesis de un posible efecto inmunomodulador de los prostasomas sobre la actividad NK en el tracto reproductor femenino.
- Los prostasomas podrían estar implicados en la protección inmunológica del espermatozoide y en su posible éxito reproductivo.

## P-040: FISH EN ESPERMATOZOIDES ALTERADO COMO INDICACIÓN DE DGP DE ANEUPLOIDIAS: ESTUDIO RETROSPECTIVO DE 105 CASOS DE CGHA

E. García-Mengual, X. Vendrell, C. Sánchez-Matamoros, M. Pardo, R. Bautista-Llácer, E. Raga, T. Alberola, R. Claramunt.

Laboratorio de Andrología, Unidad de Genética Reproductiva, Sistemas Genómicos S.L. Parque Tecnológico de Valencia, Ronda G. Marconi 6, 46980 Paterna (Valencia).

[elena.garcia@sistemasgenomicos.com](mailto:elena.garcia@sistemasgenomicos.com)

#### INTRODUCCIÓN

La asociación entre las alteraciones del seminograma, fallos previos de FIV y/o abortos de repetición, y el incremento de aneuploidías en espermatozoides de individuos con cariotipo somático normal, ha fomentado la inclusión del estudio de aneuploidía espermática en el protocolo de estudio del varón infértil/subfértil, con el fin de orientar el asesoramiento genético reproductivo. Nuestra experiencia previa en el estudio mediante FISH (hibridación *in situ* fluorescente) de  $3,5 \cdot 10^6$  espermatozoides procedentes de 870 eyaculados reveló que el 44,4% (386/870) de los casos presentaba valores de aneuploidía alterados para alguno de los 5 ó 9 cromosomas estudiados. En este contexto, los

varones con un resultado de FISH en espermatozoides alterado, constituyen un grupo de riesgo con mayor probabilidad de generar embriones aneuploides mediante técnicas de reproducción asistida.

#### OBJETIVO

Analizar con carácter retrospectivo la frecuencia de aneuploidías cromosómicas detectadas mediante CGHa en embriones en estadio preimplantación, procedentes de ciclos de DGP con una indicación de FISH en espermatozoides alterado.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Entre octubre 2010 y marzo de 2013 se realizaron un total de 105 ciclos

de DGP con indicación de FISH en espermatozoides alterado. Se analizaron un total de 702 embriones mediante CGHa. La amplificación del genoma en blastómeros de embriones en D+3 (y su correspondiente blanco), la electroforesis, el marcaje y la hibridación se realizó siguiendo el protocolo de BlueGnome® (*microarrays* 24Sure). La lectura se realizó con el "DNA Microarray Scanner G2565CA" de Agilent a una resolución de 10µm y se analizó con el software "BlueFuse Multi", (BlueGnome®). Los resultados se obtuvieron en 24-28h.

#### RESULTADOS

La edad media de las pacientes fue de 36,3 años, y la media de embriones biopsiados por ciclo

fue 6,7. El 94,9% (666/702) de los embriones tuvo diagnóstico resultando un 28,7% (191/666) de ellos normales/transferibles. Del 71,3% (475/666) restante, el 79,6% resultó aneuploide (1-4 cromosomas implicados) y el 20,4% presentó un perfil de aneuploidía compleja (más de 4 cromosomas). La frecuencia de trisomías en los embriones aneuploides fue de 40% y la de monosomías 38%. Se detectaron aneuploidías para todos los cromosomas, aunque con diferente frecuencia. Los cromosomas principalmente involucrados fueron el

1 (16.9%), 13 y 15 (13.2%), 16 (15.6%), 19 (18.3%), 22 (14.3%) y los sexuales (20,6%). Los menos involucrados, el 11 y el 12 (8,7%), el 8 (9,5%) y el 20 (9,8%). En el 80% (84/105) de los casos se detectaron embriones transferibles y en el 73% (77/105) se consiguió establecer un seguimiento que reveló un 63% de embarazo por transferencia (47/75).

#### CONCLUSIONES

En varones con FISH en espermatozoides alterado, el DGP mediante CGHa revela

un elevado número de embriones aneuploides (71,3%), tanto trisómicos como monosómicos. Los cromosomas más frecuentemente implicados (1,13,15,16,19,22 e XY) coinciden, en su mayoría, con los estudiados en el FISH de espermatozoides de 9 cromosomas. Estos resultados evidencian la importancia de la valoración de las aneuploidías en espermatozoides, para las disomías, nulisomías y diploidías. En pacientes con indicación de FISH en espermatozoides alterado, el DGP-CGHa se convierte en una estrategia clave para descartar los embriones anormales.

## P-041: LA VITRIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES MEJORA LA MOVILIDAD POST-CRIOPRESERVACIÓN EN MUESTRAS DE SEMEN CAPACITADAS CON RESPECTO A LA CONGELACIÓN DE RAMPA LENTA

B. Freijomil<sup>1</sup>, C. Encinas<sup>1</sup>, M. López-Tejón<sup>1,2</sup>, E. Velilla<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Marquès, Barcelona, Barcelona. <sup>2</sup>Fundación Leonardo Marquès, Barcelona, Barcelona.

[barbara.freijomil@institutomarques.com](mailto:barbara.freijomil@institutomarques.com)

#### INTRODUCCIÓN

Uno de los principales objetivos para conseguir una buena criopreservación de semen es aumentar al máximo la movilidad obtenida post-criopreservación. Actualmente la técnica más utilizada para congelar semen es la criopreservación por rampa lenta. La vitrificación se plantea como una técnica alternativa a la congelación lenta para evitar la formación de cristales. La eliminación de crioprotectores permeables demuestra exitosos resultados (Nawroth F *et al.*, 2002, Isachenko *et al.* 2004). Además, la sacarosa como crioprotector parece tener un efecto beneficioso en la vitrificación (Hossain *et al.*, 2007, Isachenko *et al.*, 2008).

#### OBJETIVO

El objetivo del estudio fue comparar en muestras capacitadas la movilidad de espermatozoides obtenida después de dos metodologías de criopreservación: (1) congelación en rampa lenta y (2) vitrificación.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Se capacitaron 72 muestras de donante por gradientes de densidad. De éstas, 30 muestras se criopreservaron mediante vitrificación con medio de cultivo y sacarosa al 0.5M, y 42 muestras se criopreservaron mediante rampa lenta en vapores de nitrógeno con glicerol como crioprotector. Se realizó una evaluación de la movilidad antes y después de la criopreservación, y se realizó una comparación entre ambos grupos (vitrificación y rampa lenta) mediante el test estadístico t-Student. Seguidamente se dividieron los grupos dependiendo de la concentración REM previa a la criopreservación. Se realizó comparación de las medias del % de movilidad post-criopreservación entre subgrupos mediante un análisis de la varianza ANOVA.

#### RESULTADOS

Ambos grupos (vitrificación y rampa lenta) fueron homogéneos con respecto a la concentración total (47.9M/ml vs 51.7M/ml;  $p=0.39$ ) y la movilidad

(89.91% vs 91.52%;  $p=0.27$ ) antes de la criopreservación.

La movilidad observada post-criopreservación respecto a la post-REM fue estadísticamente superior en las muestras vitrificadas que en las muestras criopreservadas mediante rampa lenta (57.0% vs 41.2% ;  $p<0.0001$ ).

El % de movilidad post-criopreservación se mantuvo igual independientemente de la concentración inicial, tanto en el grupo de espermatozoides con criopreservación lenta (42.6% vs 41.9% vs 38.9%;  $p=0.67$ ) como en el grupo de espermatozoides vitrificados (58.7% vs 60.4% vs 51.6% ;  $p=0.24$ ).

#### CONCLUSIONES

La vitrificación de espermatozoides permite la obtención de un porcentaje mayor de espermatozoides móviles y su resultado no depende de la concentración inicial de la muestra. La técnica de vitrificación podría ser un método válido para congelar muestras capacitadas de mala calidad o valiosas

en la práctica clínica. A pesar de estos resultados preliminares, deberían realizarse estudios complementarios para comprobar la integridad funcional y del DNA tras la desvitrificación, así como la capacidad de fecundación "in Vitro".

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Nawroth F *et al.*, 2002. "Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants." *Cryo Letters* 23 93-102.

Isachenko E, *et al.*, 2004 a "DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification." *Human Reproduction* 19 932-939.

Isachenko V, *et al.*, 2004 b "Cryoprotectant-Free Cryopreservation of Human Spermatozoa by Vitrification and Freezing in Vapor: Effect on Motility, DNA Integrity, and Fertilization Ability." *Biology of reproduction* 71 1167-1173.

Isachenko E, *et al.*, 2008. "Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose." *Reproduction* 136 167-173.

Hossain AM, *et al.*, 2007 "Sole use of sucrose in human sperm cryopreservation." *Arch. Andrology* 53(2) 99-103.

## P-042: EL PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES CON ADN FRAGMENTADO NO SE VE AFECTADO POR LA CONGELACIÓN NI POR LA VITRIFICACIÓN

J.J Bataller, A. Barberá, M. Tormos, M. Ferrer, M. Ruiz Jorro

CREA (Centro médico de reproducción asistida) – València. ANACER. Asociación nacional de clínicas de reproducción asistida.

[juan.bataller@creavalencia.com](mailto:juan.bataller@creavalencia.com)

#### INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

Los métodos de criopreservación son diariamente utilizados en los laboratorios de reproducción asistida. La congelación de semen se utiliza, desde hace años, para preservar y mantener los espermatozoides para su posterior uso (Bernschtein *et al.*, 1937; Polge *et al.*, 1949; Smirnov, 1949). Sin embargo, debido al daño producido por el proceso de congelación, la movilidad se reduce tras la descongelación de las muestras (Critser *et al.*, 1988; Yoshida *et al.*, 1990). La vitrificación es una técnica de congelación ultra-rápida, comparada con la congelación lenta habitual (Nawroth *et al.*, 2002; Isachenko *et al.*, 2003). Se ha sugerido que esta técnica, que se ha impuesto a la congelación lenta en ovocitos y embriones, podría ser también beneficiosa para los espermatozoides (Isachenko *et al.*, 2004; Isachenko *et al.*, 2008; Endo *et al.*, 2012). El daño físico causado por las técnicas de congelación a las membranas es bien conocido (Mossad *et al.* 1994), pero no tanto su repercusión sobre la integridad del ADN.

El objetivo del presente estudio fue comparar los efectos de la técnica de vitrificación respecto a la técnica de congelación lenta en vapores de

nitrógeno en cuanto al daño producido en el ADN espermático.

#### MATERIAL Y MÉTODO

Se han analizado un total de 25 muestras normozoospermicas. Las muestras fueron obtenidas y analizadas siguiendo los criterios OMS – V - 2010. Posteriormente se realizó una recuperación de espermatozoides móviles mediante gradientes de densidad y el pellet se separó 3 alícuotas: 1) Control, 2) Congelación Lenta, 3) Vitrificación.

La alícuota 1 se fijó inmediatamente con formaldehído al 4% para valorar posteriormente el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado (%FR).

La alícuota 2 se congeló siguiendo nuestro protocolo habitual de congelación lenta mediante vapores de nitrógeno líquido, utilizándose Test Yolk Buffer (Irvine Scientific) en proporción 1:1 y pajuelas termosellables de alta seguridad (CBS). Tras su descongelación, la muestra se fijó con formaldehído al 4%.

La alícuota 3 se vitrificó de acuerdo al protocolo que se resume a

continuación: la alícuota se dejó en una concentración aproximada de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/ml y se añadió el medio de vitrificación en proporción 1:1. Posteriormente, con una micropipeta, se dejaron caer gotas sobre el nitrógeno líquido. Una vez congeladas se introdujeron en criotubos. Para finalizar se desvitrificaron y se fijaron en formaldehído al 4%.

Una vez fijada cada alícuota, se analizó el %FR mediante TUNEL. Las muestras se sembraron en portaobjetos con poli lisina, se permeabilizaron con metanol y se incubaron con kit In Situ Cell Death Detection (Roche). Posteriormente se analizaron al menos 800 espermatozoides mediante epifluorescencia.

#### RESULTADOS

El %FR medio previo a la congelación/vitrificación, fue de  $9'33 \pm 7'59$ . El %FR medio tras congelación lenta fue de  $8'90 \pm 5'13$  y tras vitrificación fue de  $8'40 \pm 6'12$ .

Se ha realizado ANOVA multifactorial para comparar las diferencias entre control, congelación lenta y vitrificación. Tras analizar los



resultados, se ha observado que no hay diferencia significativa (0,35; P valor > 0,05) entre el % FR de el control, la congelación lenta y la vitrificación.

### CONCLUSIONES

De acuerdo con nuestros resultados ninguna de las dos técnicas, vitrificación

o congelación lenta, aumenta de forma significativa el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado.

Son necesarios más estudios para valorar el impacto de la crioconservación en el espermatozoide humano, tanto en el ADN, como en las membranas y las proteínas que lo componen, y si existe

algún tipo de ventaja en la vitrificación espermática respecto a la congelación lenta convencional.

## P-043: DESENCADENAMIENTO DE LA OVULACIÓN CON AGNRH EN CICLOS FIV/ICSI VS HCG

V. Castañón<sup>1</sup>, J. Álvarez<sup>2</sup>, D. Fernández<sup>2</sup>, E. Fernández<sup>2</sup>, P. Llana<sup>2</sup>, P. Martínez-Cambor<sup>2</sup>, M. Torrents<sup>1</sup>, L. Sánchez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Reproducción Asistida. Hospital Universitario Central de Asturias. <sup>2</sup> Oficina de Investigación Biosanitaria. Hospital Universitario Central de Asturias. [vanesa.castanon.bernardo@gmail.com](mailto:vanesa.castanon.bernardo@gmail.com)

### INTRODUCCIÓN

El síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) es una de las complicaciones iatrogénicas más importante derivada de la estimulación ovárica controlada (EOC). Aparece entre 0,1-4% de las pacientes y un 1,9% necesitan hospitalización.

Tradicionalmente, se ha utilizado la hCG para desencadenar la ovulación por su similitud con la LH.

Aunque no se conoce el mecanismo exacto, existe relación entre la hCG y el SHO, entre otras cosas, debido a su vida media.

Existen estrategias para prevenir el SHO; como el desencadenamiento de la ovulación con análogos de la GnRH (aGnRH).

El inconveniente es que el pico de LH producido no es suficiente para conseguir un embarazo evolutivo y se produce luteolisis.

Todo ello pasa por tener una técnica de criopreservación embrionaria eficiente y un buen soporte de la fase lútea.

### OBJETIVOS

- Comparar los resultados de los ciclos con aGnRH con los de hCG.

- Analizar la tasa de cancelación de ciclos antes y después del uso de aGnRH.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron dos grupos retrospectivamente, un total de 96 pacientes tratadas entre 2007 y 2012. Todas presentaban respuesta excesiva al tratamiento (E2>2600 pg/ml el 10º día de EOC y/o 19 o más folículos preovulatorios ese mismo día. Se diferenciaban en el fármaco usado para desencadenar la ovulación: *procrin*® (leuprorelina, 1mg/0,2ml) (grupo 1, n=47) u *ovitrelle*® (grupo 2, n=49) (coriogonadotropina alfa 250 µg/0,5 ml). El uso de aGnRH para desencadenar la ovulación lleva implícita la utilización de antagonistas durante la EOC.

Se comprobó la homogeneidad de los grupos mediante el estudio de variables previas a la punción así como los resultados de los ciclos en ambos grupos.

La descripción de las variables continuas se realizó mediante medias y desviaciones típicas, la comparación de medias de grupos independientes con la prueba T Student-Welch, las variables categóricas se describieron con frecuencias relativas y absolutas y la independencia entre variables categóricas se contrastó con la prueba exacta Chi-cuadrado.

Se consideraron p-valores <0,05 estadísticamente significativos.

### RESULTADOS

Los dos grupos son homogéneos en edad, FSH y E2 pero el grupo 1 tiene más folículos preovulatorios (22 vs 18,3, p=0,009). El nº ovocitos y MII son similares, mientras que con aGnRH hay más embriones de buena calidad (A y B) (4,1 vs 3, p=0,019) y más ovocitos fertilizados (7,6 vs 6,2, p=0,019).

Por el tipo de ciclo en el grupo 1 se transfieren menos embriones en fresco (solo en 13 pacientes).

En fresco la tasa de embarazo clínico del grupo 1 es 6,9% frente a 35% (p=0,008). En el embarazo bioquímico la diferencia es aún mayor (6,9% vs 40%, p=0,098).

En criotransferencias, la tasa de embarazo clínico global es 13,5%, siendo menor en el grupo 1; 4,2% vs 30,8% (p= 0,042). Las tasas de embarazo bioquímico son iguales.

Se registraron 3 casos de SHO y los tres pertenecen al grupo 2, en el grupo con aGnRH no hubo ningún caso.

La tendencia de la cancelación de ciclos es a disminuir discretamente desde la introducción de las pautas con aGnRH (aproximadamente un 1%).

## CONCLUSIONES

- El aGnRH no altera la maduración ovocitaria y se asocia a mayor calidad embrionaria. La tasa de fertilización es significativamente mayor en el grupo 1.
- La tasa de embarazo tanto de embriones en fresco como congelados es menor en el grupo en el que se utilizó análogos para desencadenar la ovulación.
- Los únicos casos de SHO vistos en nuestro centro provienen de mujeres sometidas a tratamiento con hCG.
- En el futuro se podría tratar de mejorar la tasa de embarazo con análogos, transfiriendo en fresco y suplementando la fase lútea con pequeñas dosis de hCG.

## P-044: UTILIDAD DEL CRITERIO MORFOLÓGICO EN LOS TIEMPOS DEL TIME-LAPSE

M.C. Pons, R. Noblom, I. Solvas, M. Grossmann, J. Nadal  
 Unidad de Reproducción Asistida de Centro Médico Teknon, Barcelona  
[mcpons@cmteknon.com](mailto:mcpons@cmteknon.com)

### INTRODUCCIÓN

El criterio morfológico ha sido el único criterio de evaluación de la calidad embrionaria antes de la introducción de los sistemas de *time-lapse*. Según el criterio ASEBIR, embriones con características tales como vacuolización, multinucleación o ZP dismórfica, son clasificados directamente en las categorías C y D relacionadas con un menor potencial de implantación. Por otro lado, en los sistemas *time-lapse*, cuyos pronósticos se basan en el enorme conocimiento de los parámetros cinéticos, estas características morfológicas pueden estar, en cierto modo, infravaloradas frente a la observación convencional en invertoscopio.

### OBJETIVOS

Evaluar el impacto de cada uno de los parámetros morfológicos de la clasificación ASEBIR por separado.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo de 1856 transferencias en fresco en día+3 con un total de 3638 embriones, de los cuales 2847 proceden de 1464 ciclos de FIV y 791 de 392 ciclos de donación de ovocitos desde enero 2007 a junio 2012. La media de edad de las pacientes de FIV es de 35,5 años [22-45] y la de las donantes es de 25,1 años [18-35].

Las categorías ASEBIR se han dividido en 19 subcategorías (A, B, B2, B3, C1, ...) aislando cada uno de los motivos de inclusión. Se calcula la tasa de implantación por subcategoría.

Para el análisis de la tasa de implantación únicamente se han incluido los embriones de transferencias con 0% y 100% de implantación y de transferencias homogéneas para

cada subcategoría de mujeres de edad inferior a 36 años. El total de embriones incluidos en el estudio es de 1843. Análisis estadístico: prueba de Chi cuadrado,  $P < 0,01$

### RESULTADOS

La tabla muestra las distintas subcategorías ordenadas de mayor a menor tasa de implantación. El análisis

		E. Transferidos	E. Implantados	Tasa Implantación
A	A	785	276	35,2
ZP dismórfica	C4	26	8	30,8
D+2: 3-cél. iguales	D7	13	4	30,8
D+3: 8-cél asimétricas	C5	31	9	29
Vacuolas escasas	C3	30	7	23,3
B	B	298	67	22,5
ZP dismórfica + EA	B2	28	6	21,4
D+2: 3-cél simetría OK	C7	17	3	17,6
1 única cél MN en D+3	D4	19	3	15,8
C por ritmo de división	C1	93	14	15,1
25-35% fragmentación	C2	15	2	13,3
MN en D+2 y/o D+3	D5	99	13	13,1
Diversos factores de tipo C	C6	31	4	12,9
25-35% fragmentación + EA	B3	8	1	12,5
Vacuolas abundantes	D3	11	1	9,1
Desarrollo lento	D1	168	13	7,7
Diversos factores de tipo D	D6	161	10	6,2
>35% fragmentación	D2	8	0	0
D+3: Anillo acitoplasmático	D8	2	0	0

MN=multinucleación / EA=eclósión asistida

estadístico permite agruparlas en 3 bloques según potencial de implantación. Las subcategorías con el mismo color no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

#### CONCLUSIONES

El estudio avala la fuerza predictiva de la cinética embrionaria para seleccionar

los embriones con mayor potencial de implantación.

Según nuestros datos, tanto la asimetría entre blastómeros como la presencia de escasas vacuolas (parámetro de complicada valoración en los sistemas *time-lapse*) no son determinantes, por lo que su infravaloración no significaría un inconveniente.

Por el contrario, como la presencia de multinucleación en embriones con óptimas características de desarrollo reduce drásticamente el potencial de implantación, es necesario mejorar la detección de la multinucleación en los sistemas *time-lapse* para obtener pronósticos más precisos.

## P-045: MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS INMADUROS VITRIFICADOS COMO VÍA ALTERNATIVA DE PRESERVACIÓN DE LA FERTILIDAD EN PACIENTES CON CÁNCER

I. Peinado; I. Molina; E. Novella; R. Francés; J. Gómez; J.M. Rubio; A. Pellicer  
Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Valencia  
[ipeica@hotmail.com](mailto:ipeica@hotmail.com)

#### INTRODUCCIÓN

La congelación de embriones tras FIV es actualmente el único método establecido para preservar la fertilidad en pacientes con cáncer. Sin embargo, esta opción no es factible en pacientes con cánceres hormono-dependientes.

La maduración in vitro de ovocitos (MIV) pre- o post-vitrificación evita la exposición a niveles elevados de estrógenos sin perder la oportunidad de almacenar un número suficiente de ovocitos para utilizar tras el tratamiento oncológico.

#### OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es evaluar si la MIV debe realizarse antes o después de la vitrificación de ovocitos. Es decir, si los resultados son más satisfactorios vitrificando ovocitos inmaduros (PI) o maduros (MII).

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon 310 ovocitos profase I procedentes de 171 ciclos de FIV-ICSI para realizar 2 estudios. Experimento A: 168 ovocitos que se distribuyeron en dos grupos; Grupo 1 (GA.1) 53 ovocitos vitrificados y desvitrificados en profase I y posteriormente MIV, Grupo 2 (GA.2),

38 ovocitos profase I madurados in vitro hasta metafase II, tras lo cual fueron vitrificados. Experimento B: 142 ovocitos repartidos en 3 grupos; Grupo 1 (GB.1) 41 ovocitos PI MIV y vitrificados en estadio MII, Grupo 2 (GB.2) 43 ovocitos PI sometidos a choque osmótico (medios de vitri/desvitrificación) y posteriormente MIV hasta MII, por último Grupo 3 (GB.3) constituido por 37 ovocitos vitrificados en estadio PI y MIV tras su desvitrificación.

La viabilidad de los ovocitos MII obtenidos se evaluó mediante la activación química de éstos con  $10\mu\text{M}$  ionomicina de calcio.

Se evaluaron las siguientes variables: tasa de maduración in vitro (TM), ovocitos PI que maduran hasta MII; tasa de activación (TA), MII en los que se observa 1 PN tras la exposición a ionomicina; tasa de desarrollo (TD), embrión con un mínimo de 2 células.

RESULTADOS: Experimento A: la TM fue significativamente mayor para GA.1 (GA.1=81.8% vs GA.2=41.2%;  $p=0.000$ ). La TA mostró diferencias significativas a favor del GA.1 (GA.1=85.2% vs GA.2=75%;  $p=0.443$ ). La TD fue significativamente mayor en GA.1 (GA.1=87% vs GA.2=50%;  $p=0.001$ ).

Experimento B: se advirtió un incremento significativo en la TM del GB.2 vs GB.1 (GB.1=63.4% vs GB.2=83.7% y GB.3=75%;  $p=0.034$ ). La TA no muestra diferencias significativas entre los tres grupos estudiados (GB.1=673.1%, GB.2=55.67% y GB.3=55.6%;  $p>0.05$ ). La TD no mostró diferencias significativas (GB.1=89.5% vs GB.2=70% y GB.3=73.3%;  $p>0.05$ ), no obstante sólo se obtuvieron blastocistos en el grupo GB.2.

#### CONCLUSIONES

Según nuestros resultados, los ovocitos PI tienen mayor capacidad de alcanzar el estadio MII tras MIV si previamente han sido vitrificados. Los ovocitos vitrificados en PI tienen una TA y TD comparable a la obtenida vitrificando MII MIV. El choque osmótico generado por la combinación de crioprotectores en los medios de vitrificación sería el responsable de favorecer la MIV.

La vitrificación de PI y su posterior MIV podría ser la estrategia de referencia en pacientes oncológicas: niñas pre-púberes, cánceres hormono dependientes y en aquellas donde el trasplante de corteza está contraindicado por el riesgo de reintroducir células malignas.

## P-046: ANÁLISIS MEDIANTE TIME-LAPSE DEL CULTIVO EMBRIONARIO EN PACIENTES AZOOSPERMICOS SOMETIDOS A BIOPSIA TESTICULAR

D. Gumbao, A. Sánchez-León, J. Marcos, B. Amorocho, M. Mollá, L. Fernández, M. Nicolás, J. Landeras  
IVI Murcia. Murcia. Spain  
[david.gumbao@ivi.es](mailto:david.gumbao@ivi.es)

### INTRODUCCIÓN

La inyección intracitoplasmática de ovocitos (ICSI) ha permitido, desde su aparición, luchar contra la imposibilidad que tienen los espermatozoides de algunos pacientes de fecundar por sí mismos el gameto femenino, incluyendo especialmente aquellos casos de varones sometidos a biopsia y/o aspirado de epidídimo. Además, estos últimos casos están asociados a una baja eficiencia tanto en el cultivo embrionario como de los resultados en los tratamientos de reproducción asistida.

### OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue conocer la eficiencia del uso de sistemas que incluyen el análisis del cultivo embrionario mediante tecnología time-lapse así como de conocer cuál es la cinética de división de estos embriones con un factor masculino asociado muy elevado.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron retrospectivamente 75 tratamientos llevados a cabo desde 2010 hasta la actualidad en pacientes diagnosticados de azoospermia obstructiva, siendo divididos en dos grupos, según fuesen cultivados sus embriones en incubador convencional o incubador time-lapse. Por otro lado, se analizó la cinética de división embrionaria hasta estadio de 8 células de los embriones cultivados en time-lapse y su comparación retrospectiva con un grupo control de embriones procedentes de ovodonación cultivados bajo las mismas condiciones.

Las diferencias fueron analizadas estadísticamente mediante software informático (SPSS 15.0 Inc., Chicago, IL, USA) para  $p < 0.05$ .

### RESULTADOS

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los parámetros clínicos estudiados cuando los embriones fueron cultivados en incubador convencional o time-lapse. Por otro lado, cuando se estudio la cinética embrionaria de los embriones cultivados en time-lapse (167 embriones) con respecto al grupo control de embriones procedentes de ovodonación (210 embriones), tampoco se observaron diferencias significativas, encontrándose rangos de división celular a 8 células dentro del óptimo implantatorio para ambos grupos de estudio.

### CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nos animan a seguir incorporando a los sistemas de cultivo nuevas herramientas como la tecnología time-lapse incluso para el caso de embriones tan comprometidos en su cultivo como aquellos que cuentan con un factor masculino severo. Por otro lado, el hecho de que los embriones evolutivos de nuestro estudio presenten cinética de división hasta 8 células similar a un grupo control de buen pronóstico, pese a que los resultados clínicos finales no lo sean, esto nos hace pensar que estos casos clínicos se encuentran fundamentalmente comprometidos tanto a nivel de fecundación (de

Resultados clínicos	Cultivo convencional	Sistema Time-lapse	p
Nº de tratamientos	43	32	
Nº de transferencias	30	23	
Edad	35	34	
Nº embriones transferidos	1.6	1.7	
Fecundación	58.6 % (180/307)	55.5 % (157/283)	0.44
Embarazo clínico	50.0 % (15/30)	34.8 % (8/23)	0.27
Implantación	40.0 % (18/45)	33.3 % (13/39)	0.53
Bioquímicos	11.8 % (2/17)	11.1 % (1/9)	0.96
Aborto clínico	13.3 % (2/15)	12.5 % (1/8)	0.96
Time-lapse	Sistema Time-lapse	Control	
Nº embriones	167	210	
Aparición 2 pronúcleos	10.2h	9.8h	0.13
Desaparición pronúcleos	25.0h	24.8h	0.69
División a 2 células	27.3h	28h	0.25
División a 3 células	36.2h	37.2h	0.14
División a 5 células	48.7h	49.7h	0.33
División a 8 células	59.4h	61.0h	0.17

Tabla 1. Diferencias estadísticamente significativas  $p < 0.05$

hecho, aquí ya vemos que la tasa de fecundación es menor que la de ICSI en general) como de capacidad implantatoria debido quizás a la incapacidad de estos embriones para

alcanzar satisfactoriamente el estadio de blastocisto y/o anomalías en el material genético. En cualquier caso, nuevos estudios en esta dirección (estudio time-lapse hasta estadio

de blastocisto, análisis genéticos, etc.) aportarán más información para seguir entendiendo este tipo de casos clínicos y cómo abordarlos para poder potenciar el éxito de los mismos.

## P-047: TECNOLOGÍA TIME-LAPSE APLICADA AL DESARROLLO DE LOS CIGOTOS MONOPRONUCLEARES DE ICSI

S. Mateo, C. Boller, F. Vidal, P.N. Barri, A. Veiga, M. Boada  
Institut Universitari Dexeus, Barcelona.  
[silmat@dexeus.com](mailto:silmat@dexeus.com)

### INTRODUCCIÓN

Los embriones que provienen de cigotos anormalmente fecundados suelen presentar alteraciones cromosómicas que no siempre se traducen en un bloqueo en su desarrollo in vitro. Un ejemplo de ello son los embriones procedentes de cigotos monopronucleares (1PN) post ICSI, que pueden desarrollarse hasta blastocisto pero que pueden presentar altas tasas de aneuploidia.

La tecnología time-lapse aplicada a los cigotos 1PN de ICSI puede proporcionar nueva información sobre el origen de estos cigotos y de su comportamiento durante el desarrollo in vitro.

### OBJETIVO

Evaluar, mediante tecnología time-lapse, el desarrollo embrionario de los cigotos 1PN de ICSI desde el momento de la formación del pronúcleo hasta la formación del blastocisto o interrupción de su desarrollo, para detectar posibles variaciones de los parámetros morfocinéticos respecto de los cigotos normalmente fecundados.

### MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se incluyeron 72 embriones procedentes de cigotos monopronucleares de ICSI, cultivados hasta un máximo de 6 días en un incubador Embryoscope™ (Unisense,

Dinamarca) en medios de cultivo G1 y G2 (Vitrolife® G5 series).

Se tomaron imágenes de 5 planos focales cada 15 minutos y se anotaron los tiempos en que se produjo la formación del PN, desaparición del PN, división a 2, 3, 4 y 5 células (t<sub>2</sub>, t<sub>3</sub>, t<sub>4</sub> y t<sub>5</sub>), duración del estadio a 3 células, formación del blastocisto o momento en el que se interrumpió el desarrollo embrionario.

### RESULTADOS

El momento de formación y desaparición del pronúcleo fue muy variable siendo el rango de tiempo muy amplio (9.5±2.8, rango: 4.3-21.3h; 26.9h±9.32, rango: 18.6-69.1h, respectivamente).

A lo largo de los 6 días de cultivo, los embriones bloquearon su desarrollo en distintos momentos: 5 en D1 (6.9%), 50 en D2-D3 (69.4%) (32 bloqueo desarrollo y 18 fragmentados o degenerados), 11 en D4 en estadio de mórula (15.3%) y 6 alcanzaron el estadio de blastocisto (8.3%).

Las medianas de los tiempos observados en las primeras divisiones embrionarias (t<sub>2</sub>=29.8h±8.7; t<sub>3</sub>=39.0h±7.9; t<sub>4</sub>=42.5h±8.8; t<sub>5</sub>=50.4h±12.3), así como la duración del estadio a 3 células (1.5h±4.6), fueron superiores a los valores de referencia observados en nuestro laboratorio para los cigotos normalmente fecundados (t<sub>2</sub>=27.05;

t<sub>3</sub>=38.14; t<sub>4</sub>=39.39; t<sub>5</sub>=49.96; 3 células=0.75).

### CONCLUSIONES

Se ha observado que la morfocinética de los cigotos 1PN de ICSI está alterada respecto a la de los cigotos fecundados correctamente, mostrando rangos de tiempo más amplios en la formación y desaparición del pronúcleo y retraso en las primeras divisiones embrionarias.



## P-048: EXPRESIÓN DE CLUSTERINA EN ESPERMATOZOIDE Y SU RELACIÓN CON SU CAPACIDAD FECUNDANTE

M. Hernández<sup>1</sup>, M. L. Hortas<sup>2</sup>, J. M. Marín<sup>3</sup>, Z. Caracuel<sup>4</sup>, P. Mora<sup>1</sup>, M. Redondo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Reproducción Asistida. Hospital Costa del Sol. <sup>2</sup>Servicio de Análisis Clínico. Hospital Costa del Sol. <sup>3</sup>Servicio de Ginecología y Obstetricia. Hospital Costa del Sol. <sup>4</sup>Unidad de Investigación, Hospital Costa del Sol, Marbella.  
[mariahernandez.h@hotmail.com](mailto:mariahernandez.h@hotmail.com)

### INTRODUCCIÓN

Se estima que el factor masculino es el responsable del 30% de los casos de infertilidad. El estudio básico seminal sigue siendo la primera y fundamental prueba que inicia la investigación de la posible participación masculina [21]. Actualmente el estudio del factor masculino se ha ampliado con estudios genéticos, como la integridad del ADN [6], o estudios proteómicos [8] sobre la expresión de determinados genes [17].

La Clusterina es una glicoproteína heterodimérica. En humanos, se expresa en la mayoría de tejidos y fluidos fisiológicos. Es capaz de interactuar con un gran rango de moléculas y está implicada en multitud de procesos biológicos [3]. Se ha encontrado una mayor expresión de Clusterina en algunas situaciones patológicas en las que se produce una anormal muerte celular [12], entre otras, en Alzheimer, cáncer de próstata, infarto de miocardio [1; 4; 9; 12; 16; 18]. Dentro del tracto reproductivo masculino está presente [3] y también en el espermatozoide está implicada en muchas funciones: agregación espermática, integridad del Acrosoma, capacitación espermática, fecundación, etc. [5; 8; 11; 14; 15].

### OBJETIVO

Nuestro objetivo en este trabajo fue estudiar si el grado de expresión de Clusterina, podía relacionarse con los resultados de pruebas diagnósticas, tales como, el seminograma e incluso, con el éxito de un tratamiento de Fecundación in Vitro (F.I.V). Haciéndola candidata como un nuevo factor predictor de la capacidad fértil del varón.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se tomaron a 90 pacientes que se sometieron a un tratamiento de F.I.V. junto a sus parejas en nuestro centro entre Marzo de 2011 y Noviembre de 2012. Y un grupo control de 17 pacientes, con un seminograma normal y fertilidad probada.

Previo firma de una consentimiento informado, todos entregaron una muestra de eyaculado a la que se le realizó un seminograma y un estudio de expresión proteica mediante inmunohistoquímica y Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR), en el caso del grupo de pacientes esa misma muestra también se utilizó el día de la punción folicular de sus parejas para la inseminación de los óvulos obtenidos. Las variables clínicas del estudio se tomaron de los resultados de dicho tratamiento. El análisis estadístico se realizó mediante una comparación de medias y el test de Chi cuadrado con  $p < 0,05$ .

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 90 pacientes, 28 de los pacientes presentaban algún tipo de alteración diagnóstica en su seminograma.

La técnica de inmunohistoquímica nos mostró diferentes patrones de expresión de Clusterina según su localización. Expresamos los resultados por el porcentaje de espermatozoides que presentan tinción en toda su superficie ya que está relacionada con inmadurez espermática, morfología anormal y aglutinación espermática [3; 5; 14]. Y por el porcentaje de tinción localizada en el acrosoma, relacionado con la madurez, una buena formación del acrosoma [3; 7; 8; 15], según hemos encontrado en la bibliografía. Para la interpretación de los resultados de la

qRT-PCR se realizó una normalización de los datos (Expresión relativa). Las variables clínicas tomadas fueron el porcentaje de fecundación de los óvulos sometidos a inseminación, la calidad de los embriones transferidos [2] y el resultado del Test de gestación.

Tras el análisis estadístico, encontramos diferencia significativa entre las muestras control y el grupo de pacientes, además de para las variables del seminograma, para la expresión relativa de Clusterina, siendo esta menor en el grupo control.

Al dividir las muestras según su seminograma normal o anormal, encontramos diferencias significativas para el porcentaje de tinción en toda la superficie del espermatozoide, siendo mayor en seminogramas anormales. Del mismo modo que en la expresión relativa, aunque en este caso, sin alcanzar el límite de significación. Esto se corresponde con el estudio de Zalata y colaboradores que obtuvieron una mayor expresión de Clusterina en pacientes con seminograma alterado [22]. Obtuvimos una relación inversa y con diferencias estadísticamente significativas entre la expresión relativa y la concentración Total de espermatozoides que coincide con lo obtenido para el porcentaje de tinción en toda la superficie del espermatozoide. Pero no hemos podido relacionarlos con la movilidad o la morfología como si lo han descrito los grupos de Martínez-Heredia [13] y Thacker [20].

Un resultado de interés es el alto grado de tinción en muestras que presentaban abundantes agregaciones o aglutinaciones de espermatozoides, como describió el grupo de O´Bryan. Estas uniones, en su mayoría, están formadas por espermatozoides anormales [14].

Para la expresión de la proteína localizada en Acrosoma, encontramos relación estadísticamente significativa con tres variables del seminograma: así, muestras con un alto grado de expresión de Clusterina, presentan una mayor concentración espermática total, un mayor porcentaje de movilidad y un mayor porcentaje de morfología normal. Con estos resultados podríamos relacionar, la expresión de Clusterina localizada en el Acrosoma con una mejor calidad espermática, en consonancia con el reciente artículo de Han y colaboradores [8].

No hemos encontrado diferencias significativas para ninguna de las variables clínicas.

## CONCLUSIÓN

Aunque la expresión de Clusterina localizada en Acrosoma esté relacionada con mejores características seminales, el grado de expresión absoluto de la misma nos indica lo contrario. No podemos, al menos por ahora, utilizarlo como un indicador de una mayor fecundación o del éxito reproductivo. El doble papel en la remodelación de la membrana plasmática esencial en la reacción acrosómica y en la aglutinación de espermatozoides, hace que su efecto global no sea tan positivo y no sirva como un buen predictor de la capacidad fecundante del espermatozoide. Además de esto, puede ser que la influencia del factor femenino sea la explicación a que no hayamos encontrado una relación con la calidad embrionaria ni con el test de gestación tras los tratamientos, siendo un aspecto limitante de nuestro estudio. Nuevos trabajos con mayor número de muestras se hacen necesarios.

## BIBLIOGRAFÍA

Aigelsreiter A, Janig E, Sostaric J, Pichler M, Unterthor D, Halasz J, Lackner C, et al. Clusterin expression in cholestasis, hepatocellular carcinoma and liver fibrosis. *Histopathology* 2009; 54: 561–70.

ASEBIR (Asociación para el estudio de la biología de la reproducción. Cuadernos de embriología clínica. II Criterios de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos, 2ª Edición. 2008.

**Tabla 1.**

Descriptivos					
Var. Cualitativa	Categoría	Var. Cuantitativa	Media	Error típico	Sig.
Tinción localizada en Acrosoma (%)	0	Concentración Total de espermatozoides	65	7,7	0,015
	1		94	8,7	
	0	% espermatozoides móviles	58	3,0	0,051
	1		65	2,1	
	0	% Morfología	7	0,6	0,000
	1		11	0,9	
Tinción en Toda la superficie (%)	0	Concentración Total de espermatozoides	99	9,3	0,008
	1		67	7,4	
Expresión relativa de Clusterina (qRT-PCR)	0*	Concentración Total de espermatozoides	100	11,9	0,004
	1*		90	10,1	
	2*		44	6,1	

0=valores por debajo de la mediana de la población; 1=valores por encima de la mediana de la población.

0\*=valores por debajo de la media de la población; 1\*,2\*=valores por encima de la media de la población.

**Tabla 2.**

Descriptivos					
Var. Cualitativa	Categoría	Var. Cuantitativa	Media	Error típico	Sig.
Tipo de muestra	Control	Expresión relativa de Clusterina (qRT-PCR)	1,39	0,3	0,047
	Paciente		3,22	0,4	
Seminograma	Anormal	Tinción en Toda la superficie (%)	17	3,0	0,013
	Normal		11	0,9	

Atlas-White M, Murphy BF, Baker G. Localisation of clusterin in normal human sperm by immunogold electron microscopy. *Pathology* 2000; 32: 258–61.

Califice S, Waltregny D, Castronovo V, van den Brûle F. Prostate carcinoma cell lines and apoptosis: a review. *Revue Médicale Liège* 2004; 59(12): 704-10.

Carlsson L, Ronquist G, Nilsson O, Larsson A. Dominant Prostate Immunogens for Sperm Agglutinating Autoantibodies of Infertile Men. *Journal of Andrology* 2004; 25 (5): 699-705.

Cruz I, Colmenares M, Berrueta-Carrillo L, Gomez-Perez R. Evaluación de la calidad del espermatozoide humano: comparación entre la integridad del ADN espermático y variables del semen. *Investigación Clínica* 2010; 51(1): 87-99.

Genevieve S, Griffiths, Deni S, Galileo, Rolands G, Aravindan, Patricia A, et al. Clusterin facilitates exchange of glycosyl phosphatidylinositol-Linked SPAM1

between reproductive luminal fluids and mouse and human sperm membranes. *Biology of Reproduction* 2009; 81: 562–70.

Han Z, Wang Z, Cheng G, Liu B, Li P, Li J, et al. Presence, localization, and origin of clusterin in normal human spermatozoa. *Journal Assisted Reproductive Genetic* 2012; 29: 751–7.

Hoeller C, Pratscher B, Thallinger C, Winter D, Fink D, Kovacic B, et al. Clusterin Regulates Drug-Resistance in Melanoma Cells. *Journal of Investigate Dermatology* 2005; 124: 1300–7.

Howes E.A, Hurst S, Laslop, Jones AR. Cellular distribution and molecular heterogeneity of MAC393 antigen (clusterin,  $\beta$ -chain) on the surface membrane of bull spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* 1998; 4(7): 673-81.

Ibrahim N, Gilbert GR, Loseth KJ, Crabo BC. Correlation between Clusterin-Positive spermatozoa determined by flow cytometry in bull semen and fertility. *Journal of*

Andrology 2000; 21(6): 887-94.

Kwan-Hee Y, Young-Mi J, O-Yu K. Clusterin Overexpression is Responsible for the Anti-apoptosis Effect in a Mouse Neuroblastoma Cell Line, B103. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung 2003; 58: 148-51.

Martínez-Heredia J, de Mateo S, Vidal-Taboada JM, Ballescà JL, Oliva R. Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. Human Reproduction 2008; 23(4): 783-91.

O'Bryan MK, Baker WG, Saunders JR, Kirszbaum L, Walker D, Hudson P, Liu DY, Glew MD, d'Apice AJF, Murphy BF. Human Seminal Clusterin (SP-40,40). Isolation and Characterization. Journal Clinic Investigation 1990; 85: 1477-86.

O'Bryan M, Murphy B, Liu D, Clarke G, Baker H. The use of anticlusterin monoclonal antibodies for the combined assessment

of human sperm morphology and acrosome integrity. Human reproduction 1994; 9 (8): 1490-6.

Redondo M, Rodrigo I, Alcalde J, Tellez T, Roldan J, Funez R, Diaz-Martin A, et al. Clusterin expression is associated with decreased disease free survival of patients with colorectal carcinomas Histopathology 2010; 56:932-6.

Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. Biology of reproduction 2002; 66: 1061-7.

Shannan B, Seifert M, Leskov K, Willis J, Boothman D, Tilden W, et al. Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer. Cell Death and Differentiation 2006; 13: 12-9.

Sylvester RS, Morales C, Oko R, Griswold MD. Localisation of sulphated glycoprotein-2 (clusterin) on spermatozoa and in the reproductive tract of the male rat. Biology of reproduction 1991; 45: 195-207.

Thacker S, Yadav S, Sharma R, Kashou A, Willard B, Zhang D, et al. Evaluation of Sperm Proteins in Infertile Men: A Proteomic Approach. Fertility and Sterility 2011; 95 (8): 2745-8.

World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. WHO Laboratory Manual for the examination and processing of Human Semen, 5th ed. 2010.

Zalata A, El-Samanoudy A, Salan D, El-Baiomy Y, Taymour M, Mostafa T. Seminal Clusterin Gene Expression Associated with Seminal Variables in Fertile and Infertile Men. The Journal of Urology 2012; 188: 1260-4.

## P-049: INFLUENCIA DE LA ASIMÉTRICA EMBRIONARIA EN DÍA 2 DE DESARROLLO CON LA CALIDAD EMBRIONARIA EN FASE DE BLASTOCISTO

J. Ten<sup>1</sup>; H. Blanca<sup>1</sup>; B. Moliner<sup>1</sup>; J. Guerrero<sup>1</sup>; M. Pérez<sup>1</sup>; A. Rodríguez-Arnedo<sup>1</sup>; J de Juan<sup>1,2</sup>; R. Bernabeu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Fertilidad Bernabeu, Alicante, <sup>2</sup>Cátedra de Medicina Reproductiva, Dpto. Biotecnología, Universidad de Alicante, Alicante  
[jten@institutobernabeu.com](mailto:jten@institutobernabeu.com)

### INTRODUCCIÓN

Durante las primeras divisiones mitóticas del desarrollo embrionario, no todas las células se dividen en dos células hijas iguales. Por el contrario, la fragmentación y/o las divisiones asimétricas son comunes. La división asimétrica del embrión afecta negativamente a la implantación y a la tasa de embarazo debido a la alta tasa de multinucleación y aneuploidías encontradas en estos embriones. Por el contrario, un bajo porcentaje de fragmentación parece no afectar debido a que los fragmentos acelulares pueden reabsorberse posteriormente. Existen evidencias de que la selección embrionaria en día 2 y día 3 de desarrollo basada en criterios morfológicos son

imprecisos, lo que podría resultar en una transferencia de embriones anormales o que dichos embriones se bloqueen en etapas posteriores del desarrollo. El cultivo embrionario hasta la fase de blastocisto, una vez producida la activación del genoma embrionario, permite la selección de los embriones con mayor potencial de implantación.

### OBJETIVOS

Determinar el efecto de las divisiones asimétricas embrionarias en día 2 de desarrollo sobre la calidad embrionaria en la fase de blastocisto (día 5) teniendo en cuenta la nueva clasificación embrionaria propuesta por ASEBIR. Determinar si existen diferencias sobre la calidad embrionaria

en día 5 y el embarazo clínico entre embriones asimétricos en día 2 de desarrollo en función de si presentan número de células par o impar.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio prospectivo (enero-mayo 2013) en el que se incluyen 1016 embriones procedentes de 123 ciclos de receptoras de ovocitos. Las donantes presentaron fertilidad probada y una edad media de 24,8±3,9 años. Se excluyeron del estudio los ciclos con factor masculino severo. La edad media de las mujeres receptoras fue de 41,4±3.9 años. Para la medida de la asimetría embrionaria se empleó el programa Cronus 3.7 (Research Instruments Ltd.). Se consideró un

embrión asimétrico si el diámetro del blastómero mayor y menor difirió en más de un 20% (Hardarson et al., 2001). Los embriones se clasificaron en día 5 de desarrollo siguiendo la nueva clasificación propuesta ASEBIR. El tratamiento de los datos se hizo mediante una regresión logística multinomial con categoría de referencia embriones tipo A corregidos por el factor de confusión células en día 2, mediante del programa SPSS (SPSS, Inc., Chicago, IL, UISA).

## RESULTADOS

Un embrión asimétrico en día 2 de desarrollo tuvo 8,1 veces más riesgo de ser clasificado como D en día 5 que como A, 6,2 veces más riesgo de ser clasificado tipo C que A y 4,8 veces más riesgo de ser clasificado como B que como A. Las odds ratio (OR) fueron las siguientes:

Tipo B OR: 4,8 (1,94 – 12,0) p= 0,017  
 Tipo C OR: 6,2 (2,51- 18) p= 0,000  
 Tipo D OR: 8,1 (3,4 – 19,21) p= 0,000

No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre embriones asimétricos en día 2 de desarrollo con células pares o impares comparados tanto con la clasificación ASEBIR en día 5, como con la tasa de embarazo clínico resultante de los tratamientos.

## CONCLUSIONES

Los embriones asimétricos en día 2 de desarrollo tienen tendencia a formar blastocistos de baja calidad en día 5 de desarrollo embrionario independientemente de que la asimetría sea en número celular par o impar. La tasa de embarazo clínico tampoco se ve afectada en función de este criterio.

## BIBLIOGRAFÍA

Hardarson, T., Hanson, C., Sjögren, A. y Lundin, K. (2001) Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum. Reprod.*, 16, 313-318.

# P-050: RELACIÓN ENTRE LA VELOCIDAD DE DESARROLLO EMBRIONARIO Y EL SEXO DE LA DESCENDENCIA TRAS TRA

J. Ten<sup>1</sup>; A. Sáez<sup>2</sup>; B. Moliner<sup>1</sup>; J. Guerrero<sup>1</sup>; J. Llácer<sup>1</sup>; J. de Juan<sup>1,2</sup>; R. Bernabeu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Fertilidad Bernabeu, Alicante, <sup>2</sup>Catredra de Medicina Reproductiva, Dpto. Biotecnología, Universidad de Alicante, Alicante  
[jten@institutobernabeu.com](mailto:jten@institutobernabeu.com)

## INTRODUCCIÓN

Estudios previos muestran una desviación en el sexo de los niños nacidos tras técnicas de reproducción asistida (TRA) con transferencia en día 5 de cultivo, favoreciendo éste a los varones.

Se ha observado, tanto en modelos animales como en humanos, que la velocidad de desarrollo embrionario, sobre todo en los últimos estadios preimplantacionales, es mayor en los embriones de sexo masculino que en los de sexo femenino.

## OBJETIVOS

El objetivo de este estudio es relacionar la velocidad de desarrollo embrionario tras 5 días de cultivo con el sexo de los bebés nacidos tras TRA.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se han analizado de forma retrospectiva los ciclos de fecundación *In Vitro* (tanto de ovocitos propios como de ovodonación) que resultaron en gestación, realizados en el periodo comprendido entre enero de 2008 y diciembre de 2011.

Los ovocitos fueron fecundados mediante FIV ó ICSI, según indicación clínica. Los ovocitos fecundados se mantuvieron en cultivo en el medio Cleavage Medium (Cook Medical) hasta día 3 y CCM™ (Vitrolife) hasta la transferencia en día 5.

Se seleccionaron para la transferencia los mejores embriones de la cohorte teniendo en cuenta los criterios de clasificación en la fase de blastocisto de Gardner *et al.*, (2000). Para el

presente estudio, los embriones transferidos fueron clasificados en dos grupos: embriones de desarrollo lento (compactados, iniciando cavitación y blastocistos tempranos) y embriones de desarrollo rápido (blastocistos en expansión, expandidos, iniciando eclosión y eclosionados).

Únicamente se incorporaron al estudio las gestaciones únicas en las que se transfirieron embriones en día 5 de cultivo que se clasificaron en uno u otro grupo de estudio.

Se realizó una búsqueda de factores de confusión utilizando el test chi-cuadrado para variables categóricas y t-student para variables cuantitativas. El análisis estadístico fue realizado mediante regresión logística binaria empleando el paquete estadístico SPSS.

## RESULTADOS

De los 713 nacimientos únicos, se incluyeron en el estudio 359 que fueron resultado de transferencias en día 5 de cultivo embrionario. De éstos, 130 fueron a partir de embriones de desarrollo lento y 229 de desarrollo rápido.

La variable "técnica de fecundación utilizada (FIV convencional o ICSI)" resultó ser un factor de confusión y se incorporó en el modelo de regresión logística.

El análisis estadístico mostró que cuando se transfieren embriones de desarrollo rápido, la probabilidad de que el nacido vivo sea varón es 1,7 veces mayor que de que sea mujer (OR: 1,7 (1,08-2,6),  $p=0,02$ , IC 95%).

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran que los embriones XY se desarrollan más rápidamente que los XX por lo que en el momento de la transferencia, cuando ésta se realiza en día 5, los primeros se encuentran en estadios más avanzados

de desarrollo. Estos embriones serán los mejor catalogados según las clasificaciones actuales y por tanto los candidatos a transferir e implantar.

Esto sugiere que, con la transferencia en día 5, podríamos estar generando un sesgo positivo a favor de los varones. Sin embargo, no hemos observado diferencias en los sex-ratios de las transferencias en día 5 (1,07) con respecto a las de la población general mundial (1,07), según el último registro del 7 de Mayo de CIA World Factbook.

# P-051: CULTIVO DE BLASTOCISTOS EN BAJAS CONCENTRACIONES DE OXÍGENO

C. Luna Cañas<sup>1</sup>; S. Cortés<sup>1</sup>; A. Guijarro<sup>2</sup>; M. Gago<sup>1</sup>; A. García<sup>1</sup>; R. Nuñez<sup>1</sup>; P. Caballero<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Clínica Tambre, Madrid; <sup>2</sup>Hospital Virgen de la Luz, Cuenca.

[cluna@clinicatambre.com](mailto:cluna@clinicatambre.com)

## INTRODUCCIÓN

Se han realizado numerosos estudios acerca del uso de bajas concentraciones de oxígeno (O<sub>2</sub>) durante el cultivo de embriones hasta día 2 ó 3, debido principalmente a la reducción de especies reactivas de oxígeno, pero son muy pocos en los que se ha evaluado su influencia en cultivos hasta el estadio de blastocisto.

## OBJETIVOS

Nuestro objetivo fue evaluar si existe relación en cultivos de embriones hasta el estadio de blastocisto en incubadores con baja concentración de oxígeno, la calidad de los blastocistos obtenidos, y a la tasa de implantación de estos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron 106 ciclos de cultivo largo, de pacientes de donación de ovocitos, desde Enero de 2009 hasta Diciembre de 2012. Los cultivos se realizaron en dos tipos de incubadores con diferentes concentraciones de oxígeno: se compararon los resultados obtenidos

en 44 ciclos en incubadores Cook con una baja concentración de O<sub>2</sub> (5%), y 62 ciclos en incubadores Heracell con oxígeno atmosférico (20%).

## RESULTADOS

Comparando los resultados obtenidos, observamos que se obtienen diferencias significativas en la proporción de blastocistos obtenidos de buena calidad (2,02 en Cook vs. 1,04 en Heracell) y en la tasa de implantación (56,85% en Cook vs. 40,05% en Heracell), y aunque se observan diferencias en las tasas de embarazo (70,5% en Cook vs. 58,1% en Heracell) y en la tasa de formación de blastocistos (61,57% en Cook vs. 53,67% en Heracell), estas no son significativas. También se comprobó que con bajas concentraciones de O<sub>2</sub> la proporción de ciclos en los que se obtuvo al menos 1 blastocisto de buena calidad para transferir fue estadísticamente superior (81,8%) que en O<sub>2</sub> atmosférico (61,3%).

## CONCLUSIONES

En cultivos a bajas concentraciones de O<sub>2</sub> se obtiene al menos un blastocisto

de buena calidad para transferir en un mayor número de ciclos. Esto junto a la mayor cantidad de blastocistos de buena calidad, produce una mayor tasa de embarazos, aunque con diferencias no estadísticamente significativas posiblemente por la influencia de otros factores, y una mayor tasa de implantación.

Podemos concluir que los resultados de cultivos a blastocistos son mejores en bajas concentraciones de O<sub>2</sub>, aunque se necesitarían trabajos adicionales con una mayor casuística para poder obtener resultados más concluyentes.



## P-052: EFECTO DE LA VITRIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN LOS NIVELES DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN

B. Freijomil<sup>1</sup>; C. Encinas<sup>1</sup>; S. Fernández<sup>2</sup>; C. Morales<sup>3</sup>; R. Garcia<sup>3</sup>; M. Solans<sup>1</sup>; L. Cortada<sup>1</sup>; M. Góngora<sup>1</sup>; M. López-teijón<sup>2</sup>; E. Velilla E<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Marques, Barcelona, Barcelona. <sup>2</sup>Fundación Leonardo Marques, Barcelona, Barcelona. <sup>3</sup>Centro de Medicina Embrionaria, Barcelona, Barcelona  
[barbara.freijomil@institutomarques.com](mailto:barbara.freijomil@institutomarques.com)

### INTRODUCCIÓN

La vitrificación de espermatozoides permite congelar los espermatozoides directamente introduciéndolos en nitrógeno líquido sin necesidad de utilizar crioprotectores permeables y reduciendo así el choque osmótico en el espermatozoide. La congelación de espermatozoides mediante curva lenta se ha relacionado con una alteración de los patrones de fragmentación de ADN (Donnelly *et al.*, 2001, Nassira Zribi E *et al.*, 2008, Thomson *et al.*, 2009). Debido a que la vitrificación de espermatozoides humanos es una técnica aún muy joven y no estandarizada en los laboratorios de reproducción asistida, se conocen pocos estudios que determinen su efecto sobre el ADN de los espermatozoides (Isachenko *et al.* 2004; Vutyavanish *et al.* 2012).

### OBJETIVO

El objetivo del estudio fue determinar si la vitrificación de espermatozoides altera los niveles de fragmentación de ADN.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio prospectivo de 10 muestras de semen procedentes de pacientes normozoospermicos de técnicas de reproducción asistida. Se capacitaron las muestras por gradientes de densidad seleccionando los espermatozoides de mejor calidad. Se vitrificaron con medio de cultivo y sacarosa al 0.5M, y posteriormente se desvitrificaron. Se realizó un recuento de la concentración y la movilidad y se valoró el índice de fragmentación de ADN (DFI) mediante el test SCD (Sperm Chromatin Dispersion; Halosperm®), en dos momentos del procesado de las muestras: (1) muestra post-gradiente y (2) muestra post-vitrificación. Se realizó el análisis estadístico mediante el test Wilcoxon para muestras apareadas.

### RESULTADOS

En el grupo de muestras post-gradientes se obtuvo una concentración media de 35.1M/mL $\pm$ 19.39 y un porcentaje de movilidad medio del 90.09% $\pm$ 5.48. En el grupo de muestras post-vitrificación se obtuvo una concentración media de 15.02M/mL $\pm$ 9.50 y un porcentaje de movilidad medio del 52.24% $\pm$ 9.5.

En el grupo post-gradientes se observó una mediana de DFI del 1.88% con un rango de 0.19-5.6 mientras que en el grupo post-vitrificación se observó una mediana de DFI del 1.56% con un rango de 0.28-11.81. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de fragmentación espermática entre las muestras post-gradientes previa a la vitrificación y las muestras post-vitrificación ( $p=0.99$ ).

### CONCLUSIONES

La vitrificación de espermatozoides en ausencia de crioprotectores permeables no parece aumentar la fragmentación del ADN en los espermatozoides capacitados. Esta técnica puede resultar de gran utilidad en determinados tipos de muestras como son muestras valiosas (prequimioterapias, post-mortem etc), muestras oligozoospermicas o muestras con dinámicas de fragmentación crecientes.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Donnelly ET *et al.*, 2001 "Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity". *Fertility and Sterility* 76(5):892-900.

Nassira Zribi E *et al.*, 2010 "Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity". *Fertility and Sterility* 93(1):159-66.

Thomson *et al.*, 2009 "Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis". *Human Reproduction* 24 2061-70.

Isachenko E, *et al.*, 2004 a "DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification". *Human Reproduction* 19 932-939.

Isachenko V, *et al.*, 2004 b "Cryoprotectant-Free Cryopreservation of Human Spermatozoa by Vitrification and Freezing in Vapor: Effect on Motility, DNA Integrity, and Fertilization Ability." *Biology of reproduction* 71 1167-1173.

Vutyavanich T, *et al.* 2012 "Repeated vitrification/warning of human sperm gives better results than repeated slow programmable freezing." *Assian Journal of Andrology* 14(6) 850-4.

## P-053: RESULTADOS DE CICLOS DE DESCONGELACION DE EMBRIONES VITRIFICADOS EN ESTADIO DE BLASTOCISTO EN DIA 5 VERSUS DIA 6

B. Buch; C. Segura; M. Lara; C. Alonso; R. Garnica; C. Álvarez; A. Flores; JJ. Sánchez; A. Pérez; M. Martínez-Moya.  
Laboratorio de Reproducción Centro Gutenberg, Málaga.  
[bbuch@urecentrogutenberg.com](mailto:bbuch@urecentrogutenberg.com)

### INTRODUCCIÓN

La mayoría de los embriones obtenidos en FIV/ICSI, con un desarrollo correcto, alcanzan el estadio de blastocisto en día 5 después de la fertilización, pero algunos sufren un retraso en su desarrollo y no lo alcanzan hasta el día 6. Varios estudios de ciclos con transferencia en fresco de embriones en estadio de blastocisto muestran mejores tasas de implantación y de embarazo en día 5 que en día 6. Sin embargo, los resultados publicados de los ciclos de transferencia de blastocistos congelados-descongelados son controvertidos en cuanto a la tasa de supervivencia, de gestación o de implantación, cuando se comparan ambos grupos.

### OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue comparar los resultados de ciclos de transferencia embrionaria de embriones congelados, mediante vitrificación, en estadio de blastocisto en día 5 versus día 6.

### MÉTODO

Estudio retrospectivo de 128 ciclos de transferencias de embriones vitrificados en estadio de blastocisto en día 5 (Grupo 1) o día 6 (Grupo 2), 56 ciclos con ovocitos donados (OD) y 72 ciclos con ovocitos propios (OP). La preparación endometrial de la receptora fue en ciclo natural (CN) o con terapia hormonal sustitutiva (THS) según criterios clínicos de la paciente. Los embriones se desvitrificaron al menos 2 horas antes de la transferencia embrionaria. La evaluación de la calidad embrionaria se realizó siguiendo los criterios actuales de valoración morfológica de ASEBIR. Se vitrificaron los blastocistos tipo A o B,

en estadio BEi, BE y BHi en día 5 o BE y BHi en día 6.

Se consideró que los blastocistos sobrevivieron a la desvitrificación cuando se observaron indemnes o ligeramente dañados, pero recuperaron su estructura embrionaria de antes de la vitrificación. El proceso de vitrificación-desvitrificación se realizó siguiendo el método Cryotop (Kitazato, BioPharma Co., Ltd).

Se evaluaron las tasas de supervivencia embrionaria post-desvitrificación, de implantación, de gestación y de gestación no evolutiva en ambos grupos.

### RESULTADOS

De los 128 tratamientos de descongelación estudiados, 87 fueron del grupo 1 (50 OP y 37 OD) y 41 del grupo 2 (22 OP y 19 OD). La media de embriones por ciclo de descongelación osciló entre 2,6 y 2,5 en ambos grupos, tanto en OP como en OD. 102 tratamientos se hicieron en ciclo natural y 26 con THS. Se realizaron 114 transferencias, 83 del grupo 1 y 31 del grupo 2, con una media de 1.8 embriones por transferencia en ambos grupos.

Se descongelaron un total de 328 blastocistos, 223 del grupo 1 y 105 del grupo 2, siendo la tasa de supervivencia diferente entre ambos grupos, 88.34% (197/223) y 68.57% (72/105) respectivamente ( $p < 0.001$ ). En los grupos de OP y OD los resultados fueron similares 84.25% (107/127) vs 67.27% (37/55) y 93.75% (90/96) vs 70% (35/50) respectivamente ( $p < 0.001$ ).

Las tasas de implantación, de gestación por transferencia y de embarazos no

evolutivos fueron similares en los grupos 1 y 2: 36.71% vs 25%, 55.42% vs 41.94% y 10.87% vs 15.38%, no encontrándose diferencias significativas.

### CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran una tasa de supervivencia superior de los blastocistos congelados en día 5 respecto a los congelados en día 6, tras la vitrificación-desvitrificación, tanto en los procedentes de OP como de OD. Sin embargo, las tasas de implantación, de gestación y de aborto son similares en ambos grupos.

Según estos resultados son necesarios estudios más profundos y con un mayor número de embriones para tener conclusiones más consistentes respecto a las posibles causas de estas diferencias en las tasas de supervivencia.

## P-054:EFECTO DE LA DISMINUCIÓN DEL TIEMPO DE COINCUBACIÓN DE GAMETOS EN FIV

M. Roldán; B. Gadea; L. Muela; M. Martínez; M. Muñoz; I. Pérez-Cano.  
IVI Alicante, Alicante  
[mariaroldan82@hotmail.com](mailto:mariaroldan82@hotmail.com)

### INTRODUCCION

En la FIV convencional, ovocito y espermatozoides están en contacto durante 18-20 horas. Durante este período de coincubación se generan altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que puede afectar a la fragmentación del ADN espermático, al endurecimiento de la zona pelúcida y a la calidad y potencial preimplantatorio del embrión. De hecho, hay estudios que han descrito un efecto positivo en los resultados de FIV con la disminución del tiempo de coincubación de gametos.

### OBJETIVOS

Encontrar el tiempo mínimo de incubación en FIV, sin que la tasa de fecundación se vea afectada, para minimizar los daños producidos por las especies reactivas de oxígeno.

Determinar si existen diferencias entre las técnicas de inseminación FIV 18 horas, FIV 4 horas e ICSI en los resultados clínicos, así como en la calidad de las cohortes de embriones generados en cada grupo.

### MATERIAL Y MÉTODOS

En un estudio retrospectivo, se analizaron 695 embriones procedentes de 106 ciclos del programa de ovodonación, realizados entre 2011 y 2012. Los grupos de estudio fueron FIV convencional (18-20 horas de coincubación), FIV 4 horas (4 horas de coincubación) e ICSI con ovocitos frescos.

Se calcularon los resultados clínicos: tasa de fecundación, gestación clínica, tasa de implantación, gestación evolutiva y tasa de congelación. Así como la tasa de embriones de buena calidad y el porcentaje de transferencias en D+3 y D+5.

	FIV 4H (n=19)	FIV 18H (n=23)	ICSI (n=64)	p
<b>Gestación clínica (%)</b>	63.2	52.2	54.7	NS
<b>Implantación (%)</b>	58.6	35.9	39.7	NS
<b>Gestación evolutiva (%)</b>	63.2	52.2	48.4	NS
<b>Tasa congelación(%)</b>	24.0	20.8	16.9	NS
<b>Embriones buena calidad (%)</b>	40.9 <sup>a</sup>	39.2 <sup>ab</sup>	36.4 <sup>b</sup>	0.04

Tabla 1. Resultados clínicos FIV 4h vs FIV 18h e ICSI. <sup>a, b</sup> Diferencias significativas  $p < 0.05$

En D+2 y D+3 se evaluaron: número medio de células, porcentaje y tipo de fragmentación, compactación y bloqueo.

En D+5 y D+6: porcentaje de blastocistos tempranos (BT), cavitados (BC), expandidos (BE), iniciando hatching (BHi) y hatching completo (BH). Y la tasa de blastocistos con masa celular interna y trofoectodermo de calidad buena e intermedia.

Los datos se analizaron con tablas de resultados de comparación múltiple por test de Chi-cuadrado con ajuste del p valor de HOLM. También se utilizó el Test de Wilcoxon.

### RESULTADOS

En los resultados clínicos, no se observan diferencias significativas en la tasa de fecundación, gestación clínica, implantación y gestación evolutiva, pero sí se encontró una tasa significativamente mayor de embriones de buena calidad en el grupo de FIV 4 horas frente al de ICSI. (Tabla 1)

En cuanto a las características morfológicas analizadas, hubo diferencias significativas en el tipo de fragmentación en D+3, donde FIV 18 horas presentó mayor porcentaje de fragmentación localizada que el resto.

En el D+5 de desarrollo se encontraron diferencias significativas en el grado de expansión del blastocisto, presentando el ICSI un mayor porcentaje de blastocistos cavitados y de blastocistos iniciando hatching, pero menor cantidad de blastocistos expandidos que los grupos de FIV.

### CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos evidencian un mayor rendimiento en los ciclos realizados con FIV 4 horas, lo que sugiere que éste podría ser un tiempo más óptimo para la coincubación de gametos.

En los resultados del estudio morfológico no se encontraron diferencias significativas relevantes en la calidad embrionaria, lo que anima a seguir disminuyendo progresivamente los tiempos de coincubación de gametos, con el fin de optimizar la técnica de FIV en nuestro laboratorio.

## P-055: REPERCUSIÓN MEIÓTICA Y CONSECUENCIAS REPRODUCTIVAS DE LAS ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS EN HOMBRES INFÉRTILES

O. Martínez-Pasarell, O. López, A. Mata, A. García, L. Bassas  
Laboratorio de Seminología y Embriología, Fundació Puigvert. Barcelona  
[omartinez@fundacio-puigvert.es](mailto:omartinez@fundacio-puigvert.es)

### INTRODUCCIÓN

La mayoría de los embriones obtenidos en FIV/ICSI, con un desarrollo correcto, alcanzan el estadio de blastocisto en día 5 después de la fertilización, pero algunos sufren un retraso en su desarrollo y no lo alcanzan hasta el día 6. Varios estudios de ciclos con transferencia en fresco de embriones en estadio de blastocisto muestran mejores tasas de implantación y de embarazo en día 5 que en día 6. Sin embargo, los resultados publicados de los ciclos de transferencia de blastocistos congelados-descongelados son controvertidos en cuanto a la tasa de supervivencia, de gestación o de implantación, cuando se comparan ambos grupos.

### OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue comparar los resultados de ciclos de transferencia embrionaria de embriones congelados, mediante vitrificación, en estadio de blastocisto en día 5 versus día 6.

### MÉTODO

Estudio retrospectivo de 128 ciclos de transferencias de embriones vitrificados en estadio de blastocisto en día 5 (Grupo 1) o día 6 (Grupo 2), 56 ciclos con ovocitos donados (OD) y 72 ciclos con ovocitos propios (OP). La preparación endometrial de la receptora fue en ciclo natural (CN) o con terapia hormonal sustitutiva (THS) según criterios clínicos de la paciente. Los embriones se desvitrificaron al menos 2 horas antes de la transferencia embrionaria. La evaluación de la calidad embrionaria se realizó siguiendo los criterios actuales de valoración morfológica de ASEBIR. Se vitrificaron los blastocistos tipo A o B, en estadio BEi, BE y BHi en día 5 o BE y BHi en día 6.

Se consideró que los blastocistos sobrevivieron a la desvitrificación cuando se observaron indemnes o ligeramente dañados, pero recuperaron su estructura embrionaria de antes de la vitrificación. El proceso de vitrificación-desvitrificación se realizó siguiendo el método Cryotop (Kitazato, BioPharma Co., Ltd).

Se evaluaron las tasas de supervivencia embrionaria post-desvitrificación, de implantación, de gestación y de gestación no evolutiva en ambos grupos.

### RESULTADOS

De los 128 tratamientos de descongelación estudiados, 87 fueron del grupo 1 (50 OP y 37 OD) y 41 del grupo 2 (22 OP y 19 OD). La media de embriones por ciclo de descongelación osciló entre 2,6 y 2,5 en ambos grupos, tanto en OP como en OD. 102 tratamientos se hicieron en ciclo natural y 26 con THS. Se realizaron 114 transferencias, 83 del grupo 1 y 31 del grupo 2, con una media de 1.8 embriones por transferencia en ambos grupos.

Se descongelaron un total de 328 blastocistos, 223 del grupo 1 y 105 del grupo 2, siendo la tasa de supervivencia diferente entre ambos grupos, 88.34% (197/223) y 68.57% (72/105) respectivamente ( $p < 0.001$ ). En los grupos de OP y OD los resultados fueron similares 84.25% (107/127) vs 67.27% (37/55) y 93.75% (90/96) vs 70% (35/50) respectivamente ( $p < 0.001$ ).

Las tasas de implantación, de gestación por transferencia y de embarazos no evolutivos fueron similares en los grupos 1 y 2: 36.71% vs 25%, 55.42% vs 41.94% y 10.87% vs 15.38%, no encontrándose diferencias significativas.

### CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran una tasa de supervivencia superior de los blastocistos congelados en día 5 respecto a los congelados en día 6, tras la vitrificación-desvitrificación, tanto en los procedentes de OP como de OD. Sin embargo, las tasas de implantación, de gestación y de aborto son similares en ambos grupos.

Según estos resultados son necesarios estudios más profundos y con un mayor número de embriones para tener conclusiones más consistentes respecto a las posibles causas de estas diferencias en las tasas de supervivencia.

## P-056: PRONÓSTICO DE LA DIVISIÓN EMBRIONARIA EN 24H TRAS LA DESVITRIFICACIÓN, EN UN PROGRAMA DE VITRIFICACIÓN EMBRIONARIA EN D+3

M.C. Gonzalvo López; S. Carrillo; J.A. Castilla; I. Orozco; A. Mantilla; M. Rodríguez; M.L. López; B. Romero.  
Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada  
[s.carrillolucena@gmail.com](mailto:s.carrillolucena@gmail.com)

### INTRODUCCIÓN

La supervivencia embrionaria a la vitrificación es actualmente muy alta, lo que hace que el embriólogo clínico disponga muchas veces de varios embriones a transferir. Creemos que es necesario desarrollar estrategias que lleven a seleccionar los mejores embriones, con la intención de disminuir el número de estos a transferir. Un parámetro a tener en cuenta en esta selección de embriones desvitrificados podría ser la división embrionaria después de 24h de incubación (D+3 a D+4).

### OBJETIVO

Analizar el impacto de la tasa de embarazo múltiple dependiendo de la división embrionaria en criotransferencias de 1 y 2 embriones.

### MÉTODO

Se analizan en 435 pacientes 526 criotransferencias realizadas entre 2010 y febrero de 2013, éstas se clasifican en grupos según el número de embriones transferidos y divididos:

- Criotransferencias de 1 embrión que divide (n=145).
- Criotransferencias de 2 embriones que divide 1 (n=87).
- Criotransferencias de 2 embriones que dividen 2 (n=182).
- Criotransferencias de 1 embrión que no divide (n=67).
- Criotransferencias de 2 embriones que no dividen (n=45).

Los embriones son criopreservados el tercer día (D+3) mediante vitrificación. Se utilizarán los medios comerciales de vitrificación (Medicult Vitrification, Denmark) y el dispositivo de almacenamiento Cryoleaf (McGill Cryoleaf, Origio, Denmark). El día anterior a la criotransferencia los embriones se desvitrifican, utilizando el kit de desvitrificación (Origio Warming, Denmark). Por lo que la criotransferencia se realiza en D+4, lo que nos permite observar si hay división embrionaria postdesvitrificación.

### RESULTADOS

Se observa una tasa de embarazo mayor estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en transferencias de 2 embriones con al

menos un embrión desvitrificado dividido comparado con criotransferencias sin ningún embrión dividido. Observamos una tendencia a más embarazos en criotransferencias de un embrión dividido que en criotransferencias de uno o dos embriones con ningún dividido. Se debe tener en cuenta que en las criotransferencias con embriones que no se observa división tras las 24h de incubación también se obtienen gestaciones clínicas (15.2%). La tasa de embarazo múltiple fue estadísticamente significativa mayor en el grupo de transferencias con dos embriones divididos (33,8%) que en el grupo de transferencias de 2 embriones con un embrión dividido (10.7%). En el resto de grupos no hubo ningún embarazo gemelar.

### CONCLUSIONES

El programa de transferencia de embrión único en desvitrificación debería ir dirigido especialmente a criotransferencias donde los dos embriones se dividan después de 24h de incubación. Debiendo valorarse la posibilidad de revitrificación en estos casos. Por otro lado, las transferencias de embriones no divididos presentan una tasa de gestación no despreciable.

## P-057: TRATAMIENTO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA PARA TROMBOCITOPENIA ALOINMUNE SEVERA. CASO CLÍNICO

A Rabanal<sup>1</sup>; C.Guix<sup>1</sup>; L. Zamora<sup>1</sup>; R. Olivares<sup>1</sup>; O. Serra<sup>1</sup>; S. Marina<sup>2</sup>; N. Nogués<sup>3</sup>; E. Muñiz-Díaz<sup>3</sup>.  
<sup>1</sup>Barcelona IVF, Barcelona. <sup>2</sup>Instituto de Reproducción CEFER. Barcelona. <sup>3</sup>Banc de Sang i Teixits. Barcelona.  
[anna.rabanal@bcnivf.com](mailto:anna.rabanal@bcnivf.com)

### INTRODUCCIÓN

Pareja que consulta en nuestro centro por antecedentes de dos pérdidas fetales de 28 y 33 semanas debidas

a trombocitopenia aloinmune. La trombocitopenia fetal aloinmune es la causa más frecuente de trombocitopenia grave en el recién nacido. Se produce por la acción de

aloanticuerpos maternos específicos contra un antígeno plaquetario fetal heredado del padre lo que produce la destrucción de las plaquetas fetales. La trombocitopenia fetal puede producir



hemorragia cerebral (30% de los casos) con resultado de muerte cerebral (10%) o secuelas neurológicas irreversibles (20%). La mayoría de los casos son producidos por aloanticuerpos maternos plaquetarios del tipo anti-HPA-1a. No existe un tratamiento de elección estandarizado.

#### OBJETIVO

Conseguir la gestación de un niño sano recurriendo a un tratamiento de reproducción asistida con semen de donante con un antígeno plaquetar compatible con la madre (HPA-1a). Los malos antecedentes obstétricos y la recurrencia del caso presentado hacen que ésta sea la mejor opción para esta pareja.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

En primer lugar el estudio que se realizó fue la detección e identificación de aloanticuerpos plaquetarios específicos en el suero materno así como el estudio del genotipo plaquetario de los padres. Para el estudio de aloanticuerpos antiplaquetarios se utilizaron técnicas de inmunofluorescencia en fase sólida

basadas en el enzimoimmunoanálisis (ELISA) y la técnica de MAIPA (monoclonal antibody immobilization platelet antigens) por su mayor sensibilidad. La determinación del genotipo plaquetario se realiza con técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las posibilidades de encontrar un banco compatible con el genotipo plaquetario materno compatible en este caso eran del 1,5%. Se contacta con un banco de semen para iniciar la búsqueda del donante. El banco estima el tiempo de búsqueda del donante en 3-6-9 meses. Informa además que dada la baja probabilidad de encontrar un donante, una vez finalizado el estudio, podría no encontrarse ningún donante con las características de tipaje que necesita la paciente. Pasados aproximadamente 3 meses, se encuentra un donante disponible con el genotipo plaquetar compatible con la paciente.

La paciente se sometió a un tratamiento de Fecundación *in Vitro* con un protocolo largo de aGnRH y FSHr. Se obtuvieron 9 ovocitos, 7 de ellos M II, fecundaron 5 y se transfirieron 2 embriones (B,B), los 3 embriones

restantes no pudieron ser congelados por mala calidad embrionaria.

#### RESULTADOS

El resultado fue una gestación gemelar bicorial-biamniótica sin complicaciones y con dos niñas nacidas a las 38 semanas de 2950 g y 2600 g ambas con número de plaquetas de cordón normales (>300x10<sup>9</sup>/L).

#### CONCLUSIONES

La trombocitopenia fetal aloimmune puede desarrollarse en la primera gestación. El riesgo de recurrencia en las siguientes gestaciones es muy alto, de hasta el 100% si en la gestación anterior se produjo hemorragia cerebral. Hoy en día aún no está consensuado ni el screening prenatal ni estandarizado el tratamiento. En casos como el presentado con el antecedente de dos exitus y riesgo de recurrencia de hasta el 100% la opción de realizar una técnica de reproducción asistida con banco de semen con antígeno plaquetar compatible mejora el pronóstico reproductivo de estas parejas.

## P-058: ANÁLISIS DEL RIESGO GENÉTICO REPRODUCTIVO EN PORTADORES DE REORGANIZACIONES CROMOSÓMICAS COMPLEJAS

A.Godo<sup>1</sup>, J.Blanco<sup>1</sup>, F.Vidal<sup>1</sup>, M.Parriego<sup>2</sup>, M.Boada<sup>2</sup>, E.Anton<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Biología Celular, Facultad de Biociencias, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona.

<sup>2</sup>Unidad de Medicina de la Reproducción, Departamento de Obstetricia, Ginecología y Reproducción, Instituto Universitario Dexeus, Barcelona.  
[anna.godo@uab.cat](mailto:anna.godo@uab.cat)

#### INTRODUCCIÓN

Los portadores de reorganizaciones cromosómicas complejas (CCR) presentan problemas de fertilidad debido a bloqueos meióticos y a la formación de gametos portadores de alteraciones cromosómicas. Durante la meiosis I, los cromosomas reorganizados forman un hexavalente cuya segregación en anafase I puede originar 64 productos distintos, de los cuales sólo dos presentan un contenido cromosómico normal o equilibrado.

Por otro lado, en los portadores de CCR también existe el riesgo de producción de gametos con anomalías cromosómicas numéricas debido a fenómenos de efecto intercromosómico (ICE) entre los cromosomas translocados y otros no implicados en la reorganización.

Además en portadores de translocaciones recíprocas simples se ha establecido una relación entre las anomalías cromosómicas generadas por estos dos fenómenos, observándose una mayor frecuencia de productos

de segregación desequilibrados en gametos con anomalías numéricas.

En este sentido, la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en espermatozoides permiten la evaluación de estos procesos y por lo tanto determinar el riesgo genético reproductivo de los portadores de CCR.

#### OBJETIVOS

Realizar un análisis de segregación e ICE en un individuo portador de la reorganización t(1;8;2)(q42;p21;p15)

y determinar si se produce una acumulación de productos de segregación desequilibrados en los gametos aneuploides/diploides.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó una muestra de semen de un individuo con cariotipo 46,XY,t(1;8;2)(q42;p21;p15) y astenozoospermia. Se aplicó un protocolo de FISH secuencial basado en dos rondas de hibridación sucesivas sobre los mismos espermatozoides con un diseño de sondas que permitió identificar los 64 productos de segregación de los cromosomas reorganizados. En la primera ronda se utilizó la combinación de sondas Tel 2p, Tel 1q y CEP 8. Después de su lavado, se procedió a la segunda ronda de hibridación, en la que se utilizó la combinación de sondas Tel 8p y CEP 1.

Por otra parte, también se analizó, mediante FISH, la presencia de espermatozoides con anomalías numéricas para los cromosomas X/Y,

13, 18 y 21 (AneuVysion Multicolor DNA Probe Kit; Abbott Molecular Inc). Los gametos clasificados como diploides o aneuploides fueron relocalizados y analizados para su contenido de segregación mediante las dos rondas de hibridación sucesivas descritas para el estudio de segregación.

El análisis se realizó con un microscopio de fluorescencia equipado con el sistema de análisis automático Spot AX software (Applied Imaging) que permite la relocalización de los espermatozoides analizados en diversas rondas de hibridación.

#### RESULTADOS

En el estudio de segregación, se analizaron al azar un total de 1,143 espermatozoides, observándose una producción muy baja de gametos normales/equilibrados (11.7%). La mayoría de gametos desequilibrados presentaban productos resultantes de las segregaciones desequilibradas 3:3 (43.1%) y 4:2 (28.9%).

En cuanto al análisis de ICE, en un recuento de 20,335 espermatozoides se detectaron incrementos significativos de gametos diploides y aneuploides para los cromosomas X/Y y 18 ( $p < 0.001$ ). El estudio de segregación realizado en los espermatozoides portadores de anomalías numéricas (63 aneuploidías y 129 diploidías) reveló la presencia de frecuencias incrementadas de los modos de segregación 5:1, 6:0, y de productos no esperados en estos gametos al ser comparadas con el patrón observado en los espermatozoides analizados al azar ( $p < 0.001$ ).

#### CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio demuestran la baja frecuencia de producción de espermatozoides normales/equilibrados en portadores de CCR. Además, se confirma la presencia de un patrón de segregación alterado en gametos con anomalías numéricas. Estos datos ponen de manifiesto un alto riesgo reproductivo en los individuos portadores.

## P-059: VARIACIÓN DE PH EN FUNCIÓN DEL TIEMPO, REFLEXIONES SOBRE EL USO DE MEDIOS TAMPONADOS ORGÁNICOS EN EL LABORATORIO DE FIV

J.M. de los Santos, P. Gámiz, J.L. Romero, V. García-Láez, A. Tejera, M.J. de los Santos  
Instituto Universitario IVI. Valencia.  
[josemaria.delossantos@ivi.es](mailto:josemaria.delossantos@ivi.es)

#### INTRODUCCIÓN

El pH extracelular (pHe) es una variable de importancia para optimizar las condiciones de cultivo en los laboratorios de FIV. Normalmente, se utiliza el tampón bicarbonato ( $\approx 24\text{mM}$ ) y su equilibrio con el  $\text{CO}_2$  disuelto en el medio de cultivo (MC) para ajustarlo, aceptándose como óptimo el rango entre 7,2-7,4. Para minimizar sus variaciones fuera del incubador, se usan tampones orgánicos como el HEPES ( $\text{pKa}=7,31$  a  $37^\circ\text{C}$  y  $21\text{mM}$ ). Sin embargo, existen estudios que no justifican su uso por el efecto negativo que pudiera tener sobre el desarrollo embrionario.

#### OBJETIVOS

Analizar la dinámica del pH en un MC comercial en presencia y ausencia de  $\text{CO}_2$  e intentar esclarecer el debate existente en cuanto a la idoneidad o no de la utilización de HEPES para mantener el pHe durante algunos procesos que ocurren fuera del incubador en el laboratorio de FIV.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Tras el ajuste y verificación de la concentración del 5,5% de  $\text{CO}_2$  ( $\text{CO}_2/\text{O}_2$  analyzer Kivex Biotec; termómetro digital Fluke 52 II) en un incubador Heracell

(Thermo Fisher Scientific) se monitorizó el pH en Cleavage Medium (CLVM) (COOK) mediante un pH metro no convencional denominado pH Online1-fiber-optic (MTG Medical Technology). Brevemente, la lectura del pH del MC se realiza mediante una placa de 4 pocillos específica. Uno de los pocillos, lleva incorporado un microsensor en su base, viajando un pulso lumínico a través de fibra óptica con una l específica en relación al pH del MC. La señal es analizada por el dispositivo y visualizada en el PC mediante software específico. Así se analiza el pH in situ y a lo largo del tiempo minimizando las variaciones que se darían al utilizar un pH metro convencional fuera del incubador. Se diseñaron dos

experimentos (por triplicado) para analizar el pH en dos supuestos:

**Exp 1º:** tiempo necesario para que el CLVM a 4°C (300mL), cubierto con aceite mineral (COOK) a 4°C (100mL) y CO<sub>2</sub> ambiental alcanzara un rango de pH óptimo una vez depositado en el interior del incubador a 37°C y 5,5% de CO<sub>2</sub>.

**Exp 2º:** tiempo necesario para que el medio a 37°C, cubierto con aceite mineral a 37°C y 5,5% de CO<sub>2</sub> alcance un rango de pH no óptimo una vez depositado en un incubador a 37°C y CO<sub>2</sub> ambiental.

### RESULTADOS

min	pH (± DT)	
0	7,60±0,012	EXPERIMENTO 1
150	7,40±0,012	
200	7,35±0,012	
250	7,30±0,010	
400	7,25±0,010	
1000	7,20±0,011	
1100	7,20±0,011	
1200	7,20±0,012	
0	7,20±0,011	EXPERIMENTO 2
15	7,20±0,011	
30	7,22±0,012	
45	7,25±0,010	
60	7,30±0,010	
75	7,40±0,011	
90	7,43±0,011	

### CONCLUSIONES

A pesar de la necesidad de tener en cuenta que el diseño del experimento es en condiciones estáticas y los volúmenes utilizados son diferentes a los de la rutina diaria de cultivo en microgotas, se necesitaron más 60 minutos para incrementar 0,2 puntos el pH y salir de un rango óptimo para el embrión. Como conclusión, debido a que el periodo de desgaseado no es instantáneo, algunos procesos como por ejemplo la ICSI, que actualmente se realizan con medio tamponado con HEPES, podrían sustituirse por medios basados en el tampón bicarbonato sin poner en peligro el pHe.

## P-060: INFLUENCIA DE LOS NIVELES DE PROGESTERONA, EL DÍA DE LA ADMINISTRACIÓN DE LA HCG, EN LAS TASAS DE GESTACIÓN

S. Pedrero; B. Lozano; I. Díez  
Clínica Serman, Jerez de la Frontera  
[sergiopedrero@gmail.com](mailto:sergiopedrero@gmail.com)

### INTRODUCCIÓN

En un ciclo natural, los niveles de progesterona (P4) durante la fase folicular son menores de 0,5 ng/mL.

Entre los diferentes factores que afectan a la implantación embrionaria, la elevación de los niveles de P4 al final de la fase folicular en la estimulación ovárica controlada en ciclos de FIV, parece tener un impacto en los resultados. De hecho se ha publicado recientemente que los niveles de P4 por encima de 1,5 ng/ml el día de la administración de HCG están en relación

con una disminución significativa de la tasa de gestación.

### OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es valorar la influencia de los niveles de progesterona, el día de la administración de la HCG, en las tasas de gestación.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo en la Unidad de Reproducción Asistida de la Clínica Serman a las pacientes, sin incluir el programa de ovodonación, que se

sometían a un ciclo de FIV/ICSI (grupo 1). Se estableció un punto de corte en base a los niveles de P4 el día de la administración de la HCG, 1,5 ng/mL.

Por encima de este valor, se cancelaron todas las transferencias embrionarias y se procedió a la vitrificación de los embriones. Por debajo de dicho valor, todos los ciclos siguieron la misma rutina de trabajo.

La vitrificación se llevó a cabo siempre y cuando existían embriones de buena calidad, según la clasificación ASEBIR. El método de vitrificación usado fue con el soporte Cryotop y los medios de Kytazato.

Grupo 1, pacientes con niveles de  $P_4 < 1,5$  ng/mL

Grupo 1						
n	$\bar{x}$ edad	$\bar{x}$ ovocitos	$\bar{x}$ metafases II	$\bar{x}$ embriones	$\bar{x}$ emb T	Tasa gestación
179	35,46±4,12	9,27±5,67	6,68±3,95	4,82±3,07	1,79±0,50	51,40%

Grupo 2, pacientes sin estudio del nivel de  $P_4$

Grupo 2						
n	$\bar{x}$ edad	$\bar{x}$ ovocitos	$\bar{x}$ metafases II	$\bar{x}$ embriones	$\bar{x}$ emb T	Tasa gestación
90	35,4±4,58	8,62±2,21	6,14±3,37	4,42±2,84	1,69±0,57	38,89%

Grupo 3, pacientes con niveles de  $P_4 > 1,5$  ng/mL y criotransferencias realizadas

Grupo 3						
n	$\bar{x}$ edad	$\bar{x}$ ovocitos	$\bar{x}$ metafases II	$\bar{x}$ embriones	$\bar{x}$ emb T	Tasa gestación
15	36,43±3,34	12,13±4,72	7,93±3,95	1,85±0,9	1,76±0,43	47,37%

Se estableció un grupo control de pacientes que se sometían a ciclos de FIV/ICSI en nuestro centro donde no se tuvo en cuenta el nivel de  $P_4$  (grupo 2).

También se creó un grupo de pacientes a las cuáles se les había vitrificado sus embriones por el nivel elevado de la  $P_4$ ,  $> 1,5$  ng/mL, y que ya se habían realizado la criotransferencia y teníamos los resultados del test de gestación (grupo 3).

Se tuvieron en cuenta una serie de variables paramétricas: edad, número ovocitos, número metafases II, número embriones totales y número embriones transferidos.

## RESULTADOS

Se sometieron al estudio más de 200 pacientes de las cuáles algunas de ellas no han sido incluidas en el presente trabajo al no conocerse sus resultados de gestación, o pacientes que todavía no se han realizado el ciclo de criotransferencia embrionaria.

## DISCUSIÓN

Cuando comparamos la tasa de gestación de los grupos 1 y 2 (con estudio vs sin estudio, respectivamente) se observa una diferencia, aunque no estadísticamente significativa

( $p > 0,05$ ). El grupo 3 ( $P_4 > 1,5$  ng/mL) también presenta una tasa de gestación superior al grupo 2, corroborando así la importancia de tener en cuenta el valor de los niveles de  $P_4$  el día de la administración de la HCG en nuestra Unidad de Reproducción Asistida. Siempre que el nivel de la  $P_4$  sea superior a 1,5 ng/mL se procederá a la vitrificación de los embriones para un uso posterior.

## P-061: TRANSFERENCIA EMBRIONARIA ÚNICA OBLIGADA EN PACIENTES DE BUEN PRONÓSTICO

M.L. López; M.C. Gonzalvo; A. Clavero; S. Carrillo; B. López; M. Serrano; A. Mantilla; M. Rodríguez.  
Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada  
[marisalopezregalado@gmail.com](mailto:marisalopezregalado@gmail.com)

### INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios han demostrado que la implantación de la transferencia electiva de un embrión eSET consigue disminuir la tasa de embarazo múltiple sin disminuir significativamente las tasas

de gestación en parejas seleccionadas de buen pronóstico. Sin embargo, dado que las tasas de gestación clínica publicadas sobre transferencia única obligada (cSET) oscilan alrededor del 20%, nos planteamos estudiar los resultados de ciclos de FIV/ICSI en parejas que se

realizaron cSET siendo inicialmente clasificadas como de buen pronóstico.

### OBJETIVOS

Comparar los resultados de gestación clínica en un grupo de pacientes de

buen pronóstico frente a un grupo de pacientes control, realizándose en ambos grupos cSET.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio ha sido diseñado como un estudio retrospectivo que incluye a un total de 17 pacientes del programa de FIV/ICSI de la UR del HUVN de Granada durante el año 2012 en el grupo de buen pronóstico (menores de 38 años, IMC 18,5-29kg/m<sup>2</sup>, sin abortos de repetición y sin intervenciones quirúrgicas previas ni malformaciones uterinas) y 18 pacientes en el grupo control. En ambos grupos se analizó el primer ciclo FIV/ICSI en que se obtuvo un único embrión tras la punción, por lo que se realizó una cSET. El resultado primario fue la tasa de gestación clínica, y como resultado secundario calculamos el porcentaje de transferencias con embriones de buena calidad, tomando como tales a las de embrión A ó B según la clasificación ASEBIR. Se analizaron las variables correspondientes a la respuesta a la estimulación (días de estimulación, dosis total de FSH, estradiol el día

de hCG) y a resultados de laboratorio (número de ovocitos obtenidos, número de ovocitos MII y tasa de fecundación). Se utiliza el test  $\chi^2$  para variables cualitativas y el test de la t de Student para variables cuantitativas.

#### RESULTADOS

No se observaron diferencias en la respuesta a la estimulación entre los grupos. Respecto a los resultados de laboratorio en el grupo de estudio se obtuvo una media de  $5,6 \pm 3,4$  ovocitos tras punción y una media de  $3,5 \pm 2,7$  ovocitos en MII siendo la tasa de fecundación del 38%. En el grupo control se obtuvo una media de  $4,5 \pm 2,7$  ovocitos tras punción, una media de  $3,2 \pm 2,0$  ovocitos en MII y la tasa de fecundación resultó en un 31,2%. No se encontraron diferencias significativas en ninguna de estas variables.

De las 17 parejas del grupo de estudio 15 mujeres tuvieron transferencia embrionaria quedando 9 embarazadas, frente a las 4 mujeres de las 18 del grupo control. La tasa de gestación clínica por

transferencia fue mayor en el grupo de buen pronóstico que en el grupo control (60% vs 22% respectivamente) con tendencia a la significación ( $p=0.05$ ), mientras que la tasa de embarazo evolutivo por transferencia fue del mismo modo mayor en el grupo de estudio (46,7% vs 11,1%). El porcentaje de transferencias de buena calidad en el grupo de estudio fue del 93,3% frente al grupo control que resultó en un 43,4%, lo que fue estadísticamente significativo ( $p<0.01$ ).

#### CONCLUSIONES

Nuestros resultados indican que tanto la probabilidad de tener una transferencia embrionaria con embriones de calidad A ó B como la probabilidad de gestación clínica no disminuye en parejas clasificadas como de buen pronóstico aunque sólo dispongamos de un embrión. Por tanto, estos datos sugieren que a la hora de evaluar el pronóstico de embarazo se debe tener en cuenta las características clínicas de las parejas antes que la respuesta a la estimulación.

## P-062: ESTRATEGIAS DE CULTIVO EN LOS CICLOS TEC DE PACIENTES CON TRANSFER DIFERIDO POR RSHO

R. Blanes; R. Vaca; J. González; D. Báez; R. Rodríguez; J.C. Alberto  
Unidad de Reproducción Humana del Hospital Universitario de Canarias. Tacoronte  
[rblaneszamora@yahoo.es](mailto:rblaneszamora@yahoo.es)

#### INTRODUCCIÓN

La vitrificación ha permitido conseguir una importante mejora en las tasas de supervivencia embrionaria y gestación tras la criopreservación. Esto ha mejorado mucho los resultados de transfer diferido en pacientes con RSHO (Riesgo de Síndrome de Hiperestimulación Ovárica), evitando los riesgos de la hiperestimulación ovárica y manteniendo unas buenas expectativas de gestación.

#### OBJETIVO

Es el objetivo de este estudio valorar la mejor estrategia de cultivo embrionario

en estos casos de transfer diferido para conseguir las mejores tasas de gestación.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Analizamos un total de 522 ciclos TEC correspondientes a 283 pacientes a las que se les difirió el transfer por RSHO, con tratamiento antagonista y desencadenamiento de la ovulación con agonistas de la GnRH. Estas pacientes se distribuyeron en tres grupos según tiempo de cultivo tras descongelación: Grupo 1: 2h cultivo; Grupo 2: 24h cultivo; Grupo 3: 48-72h cultivo a blastocisto. En 13 pacientes no hubo supervivencia

embrionaria y no se incluyen en estos grupos.

Todos los embriones fueron vitrificados con medio de vitrificación Origio-Medicult según protocolo indicado.

Las medias de edad de los tres grupos fueron: Grupo 1: 33,2 años; Grupo 2: 32,9 años y Grupo 3: 32,8 años (NS).

#### RESULTADOS

Si analizamos la tasa acumulada de gestación, sobre un total de 283 pacientes a las que se ha sometido de 1 a 4 ciclos TEC con la cohorte de embriones



	G-1 (N=185)	G-2 (N=195)	G-3 (N=129)	P
NºEmb.Descong	578 (3,1/pac)	776 (3,9/pac)	820 (6,3/pac)	<0.05
NºEmb.Sobrev.	449 (78%)	553 (71,3%)	584 (71,2%)	NS
Nº Transfer	185 (100%)	184 (94,3%)	109 (84,5%)	
NºEm.Transfer.	352 (1,9/pac)	358 (1,9/pac)	201 (1,8/pac)	NS
Gestaciones	53 (29%)	47 (26%)	26 (24%)	NS
Tasa Implant.	15%	13,1%	12,9%	NS

Sign. P<0.05

criopreservados del mismo ciclo, se ha conseguido un total de 126 gestaciones, un 44,5% de tasa acumulada, y siguen quedando sin desvitrificar un total de 1618 embriones que se seguirían sumando a este resultado con el tiempo.

## CONCLUSIONES

Analizando los tres grupos no observamos diferencias significativas entre las tasas de gestación por transfer y tasa de implantación,

sin embargo, existe una diferencia significativa entre los tres grupos para el número de embriones desvitrificados en cada ciclo TEC, que es mayor a mayor duración del tiempo de cultivo. Además, en los grupos de mayor tiempo de cultivo hay más cancelaciones de transfer por no evolución embrionaria.

En nuestras condiciones y medios de trabajo, obtenemos una misma tasa de implantación cuando transferimos los

embriones tras dos horas de cultivo post-desvitrificación que si hacemos cultivo de 24h o cultivo a blastocisto, pero resulta más eficaz el cultivo corto porque para conseguir la misma tasa de gestación se requiere un menor número de embriones desvitrificados.

Además de ello, se mejora sustancialmente la tasa de gestación por paciente cuando realizamos la tasa acumulada de gestación en varios ciclos TEC.

## P-063: EVALUACIÓN DE LA CALIDAD EMBRIONARIA EN DÍA 2 MEDIANTE PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS

J.V. Martínez; S. Medina; I. Molina; I. Iniesta; J. Pertusa; J.M. Rubio; A. Pellicer  
Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia  
[jvms20@hotmail.com](mailto:jvms20@hotmail.com)

### INTRODUCCIÓN

La evaluación de la calidad embrionaria basada en criterios morfológicos de los embriones transferidos es muy subjetiva y presenta una gran variabilidad intere intra-observador. En anteriores trabajos realizados por nuestro equipo, las variables morfométricas resultaron más objetivas y presentaron una mayor capacidad discriminante. Sin embargo, las bajas tasas de implantación asociada a los ciclos de FIV-ICSI dificultan la interpretación de los resultados.

### OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es demostrar la utilidad del análisis de imagen y del diseño de variables

morfométricas embrionarias en mujeres menores de 36 años con transferencia a las 48 horas post-ICSI de 2 embriones de la misma calidad (4 células iguales, simétricas y uninucleadas) con destino conocido.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo de cohortes en el que se evaluaron 346 fotografías de embriones procedentes de: 50 transferencias que no dieron lugar a gestación (0% implantación), 66 transferencias que dieron lugar a una gestación simple (50% implantación) y 57 transferencias que dieron lugar a una gestación doble (100% implantación). Solo se incluyó el primer ciclo de ICSI y se excluyeron los casos con endometriosis,

baja respuesta, malformaciones uterinas y abortos de repetición.

Las fotografías de los embriones fueron analizadas con el programa *ImageJ*. Se evaluaron las siguientes variables morfométricas: espesor de la zona pelúcida, área externa, perímetro externo, área interna, perímetro interno y factor de circularidad del embrión. Se estudiaron también las variables clínicas de la pareja que pudieran influir en la implantación. Para el análisis de los datos se utilizó un modelo de regresión logística multinomial ordinal.

### RESULTADOS

A pesar de incluir únicamente mujeres menores de 36 años se observaron

diferencias significativas en la variable clínica (edad de la mujer) que fue menor en el grupo 100% seguida de los grupos 50% y 0% de implantación respectivamente.

Se observaron diferencias significativas para las variables morfométricas que nos proporcionan información sobre características de los embriones que no podemos obtener mediante las variables morfológicas. Los embriones de menor perímetro interno, con factor de

circularidad más próximo al 1 (círculo) y menor espesor de la ZP tendrán más probabilidades de implantar.

#### CONCLUSIONES

Las variables morfométricas tienen un mayor poder de discriminación y menor subjetividad que los actuales sistemas de clasificación de embriones. Estas variables relacionadas con la forma embrionaria (factor de circularidad),

el tamaño (perímetro interno) y el grosor de la zona pelúcida no pueden ser evaluadas mediante observación óptica y son factores objetivos a tener muy en cuenta a la hora de predecir la implantación. Este método rápido, eficaz, preciso, económico y reproducible, permitiría seleccionar los embriones con mayor probabilidad de implantación, reduciendo el número de embriones transferidos y evitando en gran medida las gestaciones múltiples.

## P-064: ESTUDIO RETROSPECTIVO DEL EFECTO DE LA LUTEINIZACIÓN PREMATURA SOBRE LAS TASAS DE GESTACIÓN EN TRANSFERENCIAS DIFERIDAS

P. Gámiz; MJ. De Los Santos; A. Cobo; D. Castelló; D. Pabón; A. Mifsud.  
IVI Valencia, Valencia  
[pilar.gamiz@ivi.es](mailto:pilar.gamiz@ivi.es)

#### INTRODUCCIÓN

La elevación de los niveles circulantes de progesterona (P) en la fase folicular tardía en ciclos de estimulación ovárica controlada (COS), parece tener un impacto negativo en la implantación del embrión y por tanto en el resultado reproductivo del ciclo. Niveles de P en suero superiores a 1.9ng/ml han sido relacionados con una disminución significativa en las tasas de gestación e implantación (E. Bosch 2010) aunque el mecanismo por el cual, este aumento de P en el suero afecta al resultado del ciclo todavía no está claro. Recientes estudios sugieren que dicho aumento perjudicaría la receptividad endometrial y que en estos casos sería recomendable la transferencia diferida.

#### OBJETIVO

El objetivo del presente estudio es analizar los resultados reproductivos de las transferencias de embriones vitrificados procedentes de ciclos estimulados con P normal ( $\leq 1.9$  ng/ml) y P elevada ( $>1.9$  ng/ml) durante la fase folicular tardía.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron de forma retrospectiva 555 ciclos procedentes de pacientes con riesgo de hiperestimulación ovárica y/o P elevada en el ciclo estimulado. La transferencia de los embriones criopreservados se llevó a cabo de Enero del 2008 a Diciembre del 2012. Los embriones fueron vitrificados con Cryotop, según método descrito por Kuwayama 2005. De los 555 ciclos, 445 ciclos procedían de estimulaciones con P normal y 100 ciclos presentaban una P elevada (EIA, Architect, Abbot) el día de la administración de la hCG. Las pacientes fueron divididas en quintiles según el número de ovocitos aspirados y los datos se analizaron mediante el paquete estadístico SPSS, valores de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

#### RESULTADOS

Cuando el número de ovocitos obtenidos tras la punción folicular fue  $\geq 16$  no se encontraron diferencias

estadísticamente significativas entre el grupo de P elevada ( $n=46$ ) y el de P normal ( $n=361$ ) en cuanto a tasas de gestación (50.0% vs. 61.2%), gestación clínica (39.1% vs. 50.9%), gestación evolutiva (30.4% vs. 41.3%) e implantación (27.2% vs. 35.9%). Se observaron diferencias estadísticamente significativas en tasas de gestación entre ambos grupos cuando el número de ovocitos aspirados fue inferior a 16, los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

#### CONCLUSIONES

Al analizar los datos de las transferencias de embriones vitrificados se ha identificado un grupo de pacientes cuyas tasas de gestación e implantación se ven afectadas incluso realizando las transferencias en ciclos no estimulados. Esto puede indicar que en ciclos estimulados con niveles de P elevada, no únicamente se ve afectada la receptividad endometrial como postulan la mayoría de los estudios, sino también la calidad ovocitaria y

por tanto embrionaria. Este efecto de la P sobre la calidad ovocitaria no se observa cuando el número de ovocitos obtenidos durante la punción es elevado, ya que las tasas de gestación e implantación son comparables en ambos grupos.

OVOCITOS ASPIRADOS $\leq$ 16	P $\leq$ 1.9 ng/ml		P > 1.9 ng/ml
Nº de ciclos	87	54	---
Edad media	35.0 $\pm$ 3.7	34.8 $\pm$ 3.8	NS
Media de ovocitos aspirados	12.6 $\pm$ 3.4	10.5 $\pm$ 3.3	P<0.001
Media Estradiol (día de la hCG)	2846.6 $\pm$ 1319.7	1731.4 $\pm$ 780.3	P<0.001
Media P (día de la hCG)	0.8 $\pm$ 0.5	3.2 $\pm$ 1.4	P<0.001
Media embriones vitrificados	5.5 $\pm$ 2.5	4.1 $\pm$ 2.1	P<0.001
Media de embriones transferidos	1.9 $\pm$ 0.4	1.7 $\pm$ 0.6	P<0.001
Tasa de gestación	70.6	52.1	P=0.04
Tasa de gestación clínica	55.3	34.6	P=0.022
Tasa de gestación evolutiva	44.7	28.8	P=0.047
Tasa de implantación	36.1	26.2	NS

## P-065: IMPACTO DEL USO DE ANEXINAS SOBRE LAS TASAS DE GESTACIÓN, ¿ LAS COLUMNAS DE ANEXINAS SON UNA AYUDA EFICAZ?

E. Martínez, A. Bilbao, M. De Las Heras, Ja. Agirregoikoa, G. Barrenetxea, J. De Pablo.  
Quiron Bilbao, Bizkaia  
[emartinez.bil@quiron.es](mailto:emartinez.bil@quiron.es)

### INTRODUCCIÓN

La determinación de apoptosis en las muestras de semen es una técnica relativamente reciente. Es sabido que puede existir alta variación en el grado de apoptosis entre muestras de un mismo paciente e incluso dentro de la misma muestra con el paso de las horas. De ahí la importancia de hacer la medición pocas horas antes del ICSI sobre la muestra que va a ser utilizada en el tratamiento. En nuestro centro la determinación del grado de apoptosis seminal se realiza aproximadamente 1 hora después de la punción de la paciente, en el caso de que la muestra de semen tenga un alto grado de apoptosis (a partir de 15% de espermatozoides apoptóticos) se procede a su tratamiento mediante columnas de anexinas, esto nos permite obtener una muestra de semen con un reducido porcentaje de apoptosis.

### OBJETIVOS

El objetivo del estudio es comprobar si las tasas de gestación entre un grupo de pacientes con apoptosis normal y apoptosis alterada, tras ser

tratado con columnas de anexinas, son equiparables. De este modo comprobaremos la efectividad de las columnas de anexinas eliminando los espermatozoides apoptóticos.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se han evaluado los resultados de 122 ciclos en pacientes. Se han dividido en dos grupos, Grupo1 Apoptosis normal (N=80) y Grupo 2 Apoptosis Alterada + Columnas de Anexinas (N=43). Se han excluido aquellos pacientes en ciclo de DGP, vitrificación ovocitaria y aquellos en los que se ha cancelado la transferencia por cualquier motivo salvo los casos de vitrificación por SHEO, en los cuales únicamente se ha contabilizado el resultado de la primera transferencia.

Se han evaluado los siguientes parámetros: tasa de fecundación, calidad embrionaria (según criterios de ASEBIR), y tasa de gestación, considerándose esta positiva con la presencia de al menos un saco gestacional en la semana 7. Además se ha valorado que no sean otros los parámetros que afecten a los resultados

manteniendo la edad y el porcentaje de embriones transferidos homogéneo entre ambos grupos.

Se ha utilizado el test  $\chi^2$  para analizar los resultados estadísticos.

### RESULTADOS

No se encontraron diferencias significativas en la tasa de fecundación 73,61% vs 80,792% para el grupo 1 y 2 respectivamente.

Tampoco se encontraron diferencias en la calidad embrionaria A+B 36,52% vs 37,54% para el grupo 1 y 2 respectivamente.

Debido al limitado número de casos del que disponemos a pesar de encontrar diferencias en la tasa de gestación, 33,75% vs 51,16% (p< 0.776) estas no son estadísticamente significativas.

### CONCLUSIONES

Tanto la tasa de fecundación como la calidad embrionaria no parecen mejorar con el uso de columnas de anexinas. Sin embargo, en los casos de apoptosis

alterada mejora la viabilidad del REM seminal hasta el punto de producir no solo tasas de gestación equivalentes, sino mejores que incluso los casos con apoptosis no alterada. Es posible que las columnas de anexinas nos ayuden a

seleccionar espermatozoides de mayor calidad, mejorando parámetros que no podemos percibir cuando realizamos ICSI. Combinando el uso de anexinas con la selección de morfología y movilidad que usamos diariamente al

hacer un ICSI, parece que podremos mejorar las tasas de gestación. Es necesario que continuemos con el estudio para contar con un número suficiente de pacientes que aporten fiabilidad a los resultados.

## P-066: DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL MEDIANTE ACGH. RESULTADOS PRELIMINARES EN CEFIVA

M. L. Pigni, P. Duque, L. M. R. Menes, F. Graña, V. Sánchez, J. Quintana, E. García, P. E. de la Fuente, C. García-Ochoa.  
CEFIVA, Oviedo  
[paloma@cefiva.com](mailto:paloma@cefiva.com)

### INTRODUCCIÓN

La hibridación genómica comparada (CGH) fue descrita por Kallioniemi y cols. en 1992. En 1996, con la modificación del protocolo (Wells y Delhanty), se consiguió el análisis de todo el complemento cromosómico. Esto solventaba el principal problema del diagnóstico genético preimplantacional (DGP) mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH), la limitación en cuanto al número de cromosomas analizados (hasta 12). Actualmente, la técnica denominada array-CGH (aCGH) es la más utilizada en ciclos de microinyección espermática (ICSI) con DGP. La técnica a-CGH permite, además del análisis de todos los cromosomas, el estudio de aquellos implicados en una translocación, siempre que los fragmentos translocados tengan un tamaño superior a 6Mb.

### OBJETIVO

Conocer los resultados preliminares del programa de ICSI-DGP desde el comienzo de la aplicación de la técnica aCGH en CEFIVA.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron 17 ciclos de ICSI con DGP mediante aCGH durante el periodo comprendido entre octubre de 2011 y abril de 2013 (5 translocación recíproca, 3 FISH espermatozoides alterado, 2 translocación robertsoniana, 2 abortos repetición (AR), 1 translocación

recíproca más FISH espermatozoides alterado, 1 edad materna avanzada (EMA) más anomalía previa, 1 EMA más biopsia testicular, 1 aborto más anomalía previa, 1 deseo pacientes).

Los blastómeros fueron biopsiados en día 3 en medio Quinn´s Advantage® con HEPES (SAGE) libre de  $Ca^{+2}$  y  $Mg^{+2}$ . Cada blastómero se transfirió a un tubo de PCR con 2.5 µl de medio de lavado. Las muestras se enviaron a un laboratorio externo para su análisis. El resultado se recibió en día 5, día en que se realizó la transferencia embrionaria, en caso de tener lugar.

### RESULTADOS

Se analizaron 128 embriones mediante la técnica a-CGH, de los cuáles, 113 obtuvieron diagnóstico (88.28%). El porcentaje de embriones normales respecto de los diagnosticados fue del 20.35%. La media de embriones transferidos fue 1.75 y hubo 9 ciclos sin transferencia (52.94%). La tasa de gestación por ciclo se situó en el 17.64%, la tasa de gestación por transferencia fue del 37.5% y la tasa de implantación del 35.7%.

### CONCLUSIONES

La aplicación de aCGH a los ciclos de ICSI-DGP nos ha permitido obtener diagnóstico de un buen porcentaje de los embriones analizados. Por otro lado, la técnica aCGH ha demostrado ser de gran utilidad clínica mejorando

la selección de los embriones, y como consecuencia, permitiendo obtener una tasa aceptable de gestación. Sin embargo, debido al bajo número de casos de este estudio, aún debemos continuar analizando nuestros datos.

## P-067: EFECTO DEL SNP N680S DEL RECEPTOR DE LA FSH (FSHR) SOBRE LA RESPUESTA OVÁRICA EN DONANTES DE OVOCITOS

J.A. Ortiz; A. Turienzo; B. Lledo; J. Guerrero; R. Morales; J. Ten; J. Llacer; R. Bernabeu.  
Instituto Bernabeu Biotech, Alicante  
[jaortiz@institutobernabeu.com](mailto:jaortiz@institutobernabeu.com)

### INTRODUCCIÓN

Existe una variabilidad interindividual en la respuesta a ciertos fármacos. Determinados factores genéticos podrían explicar tales diferencias. La hormona FSH (*follicle-stimulating hormone*) juega un papel muy importante en la reproducción humana, ejerciendo su papel fisiológico mediante la unión a su receptor (FSHR). La respuesta ovárica de las mujeres que se someten a TRA mediante el empleo de gonadotropinas varía enormemente. Se han descrito diversos polimorfismos (SNPs) del gen del receptor de FSH que pueden modificar la afinidad entre la hormona y el receptor y explicar tales diferencias. Estudios clínicos han demostrado que los pacientes infértiles portadores del genotipo S680 requieren más gonadotropinas durante la estimulación ovárica.

### OBJETIVOS

El objetivo de este estudio es determinar si el SNP N680S en el gen FSHR tiene valor

predictivo de la respuesta ovárica en donantes de ovocitos. Se empleará esta población como modelo de pacientes fértiles sin factores de confusión.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se llevó a cabo el genotipado del polimorfismo N680S en el gen FSHR en 145 donantes de ovocitos. Se utilizó el kit TaqMan prediseñado para el SNPs rs6166 (Life Technologies Corporation). Se llevaron a cabo 355 ciclos de estimulación ovárica en donantes empleando FSH urinaria en un protocolo antagonista empleando LH como desencadenante. Las receptoras siguieron un protocolo convencional de preparación endometrial. La estadística se realizó empleando el software SPSS y el test chi-cuadrado para las variables categóricas, y regresiones lineales para las continuas con una significación de 0.05.

### RESULTADOS

Se mostraron diferencias significativas entre genotipos en el recuento de

folículos antrales ( $16.5 \pm 5.0$  para NN,  $14.4 \pm 4.8$  para NS y  $13.8 \pm 4.0$  para SS), número de ovocitos recuperados ( $21.5 \pm 9.2$  para NN,  $17.9 \pm 7.6$  para NS y  $19.5 \pm 8.8$  para SS) y dosis de gonadotropinas ( $2149.5 \pm 552.3$  IU para NN,  $2023.5 \pm 490.1$  IU para SS y  $2098.5 \pm 639.4$  IU para NS). Los resultados del ciclo (tasa de beta-HCG positiva, aborto y embarazo evolutivo) no se vieron afectadas por el polimorfismo N680 en el gen FSHR en donantes de ovocitos.

### CONCLUSIONES

En una población fértil de donantes de ovocitos, el SNP N680S en el gen FSHR está asociado con diferentes respuestas a las gonadotropinas en ciclos de estimulación ovárica. Por tanto, el genotipado del gen FSHR es un factor determinante en el pronóstico del ciclo de estimulación ovárica en pacientes fértiles normovuladoras.

## P-068: LA SELECCIÓN ESPERMÁTICA A ALTA MAGNIFICACIÓN MEJORA LA CALIDAD EMBRIONARIA

M. A. Fernández-Pérez, V. Sotelo, V. Villalobos, J.A. Sánchez-Férez, A. Callizo  
Instituto Murciano De Fertilidad (IMFER), MURCIA  
[mfernandez@imfer.com](mailto:mfernandez@imfer.com)

### INTRODUCCIÓN

Según la bibliografía, la morfología espermática (ME) está estrechamente relacionada con la viabilidad del embrión, determinando su potencial evolutivo. Por tanto, la selección adecuada del espermatozoide a

inyectar es clave, especialmente en aquellos casos con ME alteradas, para la consecución de un embarazo a término con recién nacido vivo sano.

La selección espermática a alta magnificación y su posterior microinyección en el ovocito (IMSI)

permite una selección adecuada del espermatozoide basada en su morfología. Aunque muchos estudios apoyan y confirman esta teoría, pocos han valorado la implicación del espermatozoide en el desarrollo embrionario in vitro. Por tanto, el objetivo del presente estudio



fue conocer el impacto que tiene el empleo de espermatozoides morfológicamente seleccionados sobre la fecundación, el desarrollo embrionario en día +3 y día +5, la tasa de embarazo y de aborto.

## MATERIAL Y MÉTODO

Estudio prospectivo aleatorizado sobre ciclos de FIV realizados en nuestro centro entre sept 2010 hasta sept 2012. Un total de 188 parejas reunieron los criterios de selección (<39 años, factor masculino) y fueron incluidas en el estudio, de las cuales 83 parejas se les realizó IMSI, frente a las 85 restantes que realizaron ICSI (grupo control) de manera aleatoria. Cuando se realizó IMSI, se seleccionaron e inyectaron los mejores espermatozoides observados en las muestras seminales a resolución de 6.600-10.000x. Análisis estadístico: La comparación de medias se efectuó mediante la prueba t de Student utilizando el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 19 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Los datos en porcentajes fueron comparados mediante el test de Fisher.

## RESULTADOS

No se encontraron diferencias significativas entre los 2 grupos de estudio en cuanto a edad y número medio de ovocitos obtenido por ciclo, tanto totales como maduros MII, por lo que ambos grupos fueron comparables.

En la tabla 1, se calcularon los porcentajes de los embriones desarrollados en D3 y D5 con respecto al número de ovocitos microinyectados, no observándose diferencias significativas entre ambos grupos, salvo para el estadio de blastocisto D5 de buena calidad ( $P < 0,004$ ).

En la tabla 2 se recogen los resultados reproductivos en términos de embarazo clínico, embarazo evolutivo, abortos, partos y recién nacido vivo. Las tasas de partos y de recién nacidos vivos tendieron a ser superiores ( $P = 0,07$  y  $0,08$ , respectivamente) en el grupo de IMSI.

Tabla 1. Preembriones D3 y D5 obtenidos mediante ICSI e IMSI.

	PROCEDIMIENTO		P
	ICSI	IMSI	
OVOCITOS FECUNDADOS (%)	501 (78,7)	511 (79,1)	0.87
PREEMBRIONES D3 (%)	332 (52,2)	351 (54,4)	0.59
PREEMBRIONES D3 BUENA CALIDAD (%)	186 (29,2)	228 (35,3)	0.17
BLASTOCISTOS D5 (D3/D5; %)	34/20 (58.8%)	77/53 (68.8%)	0.38
BLASTOCISTOS D5 BUENA CALIDAD (D3/D5; %)	34/8 (23.5%)	77/42 (54.5%)	0.0035

Tabla 2. Resultados clínicos tras las transferencias de embriones obtenidos por ICSI e IMSI.

	PROCEDIMIENTO		P
	ICSI	IMSI	
NÚMERO DE TRANSFERENCIAS	85	83	
EMBRIONES TRANSFERIDOS (medias±SEM)	1,9±0,03	1,9±0,03	0.75
EMBARAZOS (%)	31 (36,5)	41 (49,4)	0.12
ABORTOS (%)	7 (22,6)	6 (14,6)	0.53
PARTOS (%)	24 (28,2)	35 (42,2)	0.07
RECIÉN NACIDOS VIVOS (%)	29 (34,1)	40 (48,2)	0,08
PARTOS MÚLTIPLES (%)	5 (20,8)	5 (14,3)	0,72

## CONCLUSIONES

Los embriones producidos por IMSI presentaron una calidad superior en embriones D5 (blastocistos). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en cuanto a embarazos, abortos y partos múltiples tras las transferencias realizadas con embriones producidos por ICSI e IMSI, aunque hubo una tendencia a favor de la IMSI. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos por otros autores según la bibliografía.

## P-069: EVOLUCIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL EN UNA POBLACIÓN JOVEN DE CANDIDATOS A DONANTES DE SEMEN MEDITERRÁNEOS ENTRE LOS AÑOS 1999 Y 2013

A. Yoldi; A. Vaquero; D. Rodríguez; A. Vargas y J. Alonso  
CEIFER. Centro de Estudios e Investigación de la Fertilidad. Granada.  
[alberto.yoldi@ceifer.com](mailto:alberto.yoldi@ceifer.com)

### INTRODUCCIÓN

Existen gran cantidad de estudios en la literatura científica a favor y en contra de un descenso de la calidad seminal en los últimos 50 años. Desde hace varios años, nuestro laboratorio viene desarrollando estudios que se suman a este campo de discusión andrológica.

### OBJETIVOS

Evaluar si los principales parámetros de calidad seminal han disminuido en una población joven de origen mayoritariamente mediterráneo, durante los años 1999 y 2013.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Parámetros analizados: volumen seminal, concentración espermática, cantidad total de espermatozoides por eyaculado y movilidades tipo a y a+b. Las muestras proceden de aspirantes a donantes de semen que acuden a nuestro centro. Los outliers se han eliminado por el método del recorrido intercuartílico. Se han excluido del estudio los grupos raciales no caucásicos e individuos mayores de 30 años de edad. Se han analizado 2967 muestras de semen. Condiciones preanalíticas: período de abstinencia 72 – 120 horas, tiempo máximo de análisis tras eyaculación 30 minutos, masturbación en el laboratorio. La serie es de una edad media muy joven ( $21,6 \pm 3,1$  años). Análisis realizado mediante metodología WHO (1999 y 2010). El personal investigador participa en el Control de Calidad Externo de la ESHRE desde el año 1999 y organiza, desde el mismo año, el Control de Calidad Externo de Análisis de Semen auspiciado por ASEBIR.

Se han diferenciado dos grupos de edad para el posterior análisis estadístico

(18-24 años y 25-30 años). Además, hemos diferenciado las variables en cuatro grupos, atendiendo a las estaciones climáticas.

Se ha aplicado el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnoff. Se han aplicado tests de diferencias de poblaciones no paramétricos de Kruskal-Wallis y de Whitney-Mann, según los casos.

Hemos desarrollado rectas de regresión y análisis de correlaciones, con el coeficiente Rho de Spearman, para relacionar las variables dependientes estudiadas con las variables independientes años de estudio y estaciones del año. Los niveles de significación son de  $p < 0,05$ .

### RESULTADOS

Al aplicar el análisis de Kruskal-Wallis todos los parámetros estudiados presentan diferencias significativas con el paso de los años. Con el test de Whitney-Mann vemos que todos los parámetros son mayores en el grupo de mayor edad (25-30 años). Sólo presentan significación estadística la cantidad total de espermatozoides por eyaculado y los espermatozoides tipo a.

Todos los parámetros estudiados, a excepción del volumen, descienden con los años. Estas tendencias, se repiten en los estudios por edades y estaciones. Los bajos valores de los coeficientes de regresión y correlación indican una pobre relación lineal del paso de los años con las variables estudiadas y con los grupos de edad.

Durante los meses calurosos, la concentración seminal y el número total de espermatozoides eyaculados disminuyen, mientras que el volumen y los parámetros de movilidad

experimentan un incremento. Tan solo el % de espermatozoides tipo a presenta significación estadística ( $p < 0,05$ ).

### CONCLUSIONES

Se aprecia un descenso en la calidad seminal con el paso del tiempo sin significación estadística. Además, los espermatozoides con movilidad progresiva y el total de espermatozoides eyaculados presentan mejores resultados en el grupo de mayor edad (hasta 30 años). Durante los meses más calurosos disminuye la concentración y el total de espermatozoides eyaculados mientras que el volumen y la movilidad aumentan. No obviamos la autoselección que puede presentar nuestro estudio basado en donantes de semen y que se encuentra descrita en la literatura científica.

## P-070: MINIMIZACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO, MEDIANTE MACS, EN CICLOS DE FIV

J. Gijón, M. de la casa, T. Sánchez, C. Pérez, L. Martínez, I. Lozano, M.C. Cañadas, J. Rodríguez, R. Bonache, M. Alcaraz, V. Badajoz  
GINEFIV, Madrid.  
[juliogij@gmail.com](mailto:juliogij@gmail.com)

### INTRODUCCIÓN

La fragmentación del ADN espermático es un importante factor de infertilidad. Puesto que muchos estudios centran su causa en el estrés oxidativo, que conlleva la formación de especies reactivas del oxígeno, perjudiciales para la integridad del material genético; existe la posibilidad de intentar disminuir el daño mediante la administración de fármacos antioxidantes.

A pesar de los mecanismos de autorreparación del ADN seminal, no siempre su reparación completa es posible.

En estos casos, el uso de la separación magnética espermática mediante columnas de Anexina V (MACS), puede permitirnos realizar una selección óptima de gametos, con el fin de mejorar los resultados en parejas con problemas de infertilidad; ya que con esta técnica, se reduce de forma muy significativa el porcentaje de espermatozoides con marcadores apoptóticos activados.

Por otra parte, puesto que la tasa de fragmentación aumenta cuanto más tiempo pasan los espermatozoides en el epidídimo, así como en el trayecto hasta la eyaculación, minimizaríamos este efecto proponiendo un periodo de abstinencia inferior a 24 horas y un rápido procesamiento de la muestra.

### OBJETIVO

Mejorar la tasa de embarazo en parejas con problemas de infertilidad que puedan ser debidos a la fragmentación del ADN espermático.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Analizaremos, de forma retrospectiva, una cohorte de 204 pacientes que han

realizado previamente un ciclo de FIV sin éxito y en los que un estudio de fragmentación mediante la técnica SCD, presentó un índice de fragmentación de ADN espermático (Idf) patológico.

Creamos 2 grupos a estudiar: 1) Pacientes a los que se capacitó con MACS la muestra seminal, obtenida tras punción folicular (protocolo de fragmentación alterada) (Idf 36,12%); 2) Pacientes a los que no se realiza protocolo de fragmentación alterada, en una muestra igualmente obtenida tras la punción (Idf: 35,61%).

La media de edad en ambos grupos es similar (36,12 y 35,61) y no poseen otra patología asociada conocida.

Analizaremos los siguientes parámetros: número de embriones, calidad embrionaria y las tasas de fecundación, embarazo, embarazo clínico y aborto.

Las condiciones de estimulación ovárica de la pareja, así como las condiciones de preparación seminal, cultivo embrionario, microinyección espermática y selección embrionaria fueron similares.

### RESULTADOS

En ambos grupos, obtenemos un número de embriones similar. Sin embargo, aparece un porcentaje mayor de embriones de primera categoría en pacientes que se realizan MACS. El porcentaje de fecundación es muy similar en ambos grupos.

Las tasas de embarazo, embarazo clínico y aborto sí reflejan grandes diferencias.

La tasa de embarazo es muy superior cuando se realiza la separación magnética (47% vs 21%) lo cual se corrobora estadísticamente. La tasa

de embarazo clínico también es mucho mayor en pacientes con MACS (43% vs 14%), así como la tasa de aborto, la cual es significativamente menor (13% vs 36%).

### CONCLUSIONES

La separación magnética de espermatozoides en columnas de anexina se revela como una eficaz técnica para minimizar la tasa de fragmentación espermática, antes de intentar técnicas más invasivas como el TESE, en ciclos de ICSI para pacientes con fragmentación patológica.

El rápido procesamiento de la muestra seminal, junto con la técnica de MACS, puede ayudar a estos pacientes a mejorar sus resultados de un modo sencillo y de bajo coste.

## P-071: CARACTERIZACIÓN Y FUNCIÓN DE LOS MIRNAS PRESENTES EN ESPERMATOZOIDES DE INDIVIDUOS FÉRTILES

A. Salas-Huetos<sup>1</sup>; J. Blanco<sup>1</sup>; F. Vidal<sup>1</sup>; J. M. Mercader<sup>2</sup>; N. Garrido<sup>3</sup> y E. Anton<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). Bellaterra, Spain. <sup>2</sup>Joint IRB-BSC program on Computational Biology, Barcelona Supercomputing Center (BSC). Barcelona, Spain. <sup>3</sup>Laboratorio de Andrología y Banco de Semen, Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) Valencia. Valencia, Spain.

[albert.salas@uab.cat](mailto:albert.salas@uab.cat)

### INTRODUCCIÓN

Los microRNAs (miRNAs) regulan la expresión génica de numerosos procesos biológicos. Recientemente se han identificado perfiles alterados de expresión de miRNAs asociados a diferentes casos de infertilidad masculina. Sin embargo, todavía no se ha descrito el perfil de miRNAs presentes en espermatozoides de una población amplia de individuos fértiles.

### OBJETIVOS

Determinar el contenido y la abundancia relativa de los miRNAs presentes en espermatozoides de individuos fértiles. Evaluar el grado de homogeneidad de la población analizada y la existencia de correlación entre los perfiles de miRNAs y los parámetros seminales y la edad de los individuos. Identificar las funciones biológicas enriquecidas entre las dianas de los miRNAs identificados.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron muestras de semen procedentes de diez individuos donantes fértiles. A partir de la fracción espermática se obtuvo el RNA total mediante el método *TRIzol*. Las muestras de RNA fueron retrotranscritas con el *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* y el cDNA resultante fue preamplificado utilizando el *TaqMan® PreAmp Master Mix*. El *TaqMan® Array Human MicroRNA A+B Set v3.0 Kit* permitió cuantificar la expresión de 736 miRNAs.

Los datos fueron procesados mediante los programas SDS v.2.3 y RQ-Manager v.1.2. Los valores de Ct se clasificaron como determinados

(Ct=15-35), indeterminados (Ct≥35) y no informativos. Estos valores se normalizaron mediante el método de MCR que utiliza la media de expresión de todos los ensayos de cada placa.

El análisis estadístico se hizo utilizando paquetes estadísticos implementados en entorno R v.2.14.2. Todos los análisis se realizaron considerando los miRNAs determinados en todas las muestras y estableciendo como significativos los p-valor<0.05, corregidos por Bonferroni. Mediante el test de Spearman analizamos el grado de correlación entre muestras, la relación entre los perfiles de expresión de miRNAs y los parámetros de edad, volumen seminal, concentración espermática, motilidad y morfología, así como la existencia de parejas estables de miRNAs.

Se evaluaron las dianas de los miRNAs determinados presentes en todas las muestras mediante el programa *DIANA-microT v.3.0* (criterio estricto miTG>19). El listado de dianas se analizó mediante la plataforma *DAVID Bioinformatics Resources v.6.7* con el fin de identificar procesos biológicos enriquecidos.

### RESULTADOS

De los 736 miRNAs analizados, 221 fueron detectados en todos los individuos, 452 miRNAs solo en algunos de ellos y 63 en ninguna muestra.

El análisis de correlación entre muestras reveló resultados significativos entre todas ellas (rangos de rho=0.611-0.932). No se encontró correlación entre los niveles de expresión de los miRNAs y los distintos parámetros estudiados después de corrección por comparaciones múltiples. Las correlaciones entre miRNAs mostraron

resultados significativos en un conjunto de 48 pares (rho>0.9). Las tres parejas más estables fueron: miR-20a-5p/miR-106a-5p, miR-152/miR-218-5p y miR-512-3p/miR-517a-3p.

El programa *DIANA-microT* predijo 2357 dianas para los miRNAs detectados en todas las muestras. El análisis de ontología génica puso de manifiesto un enriquecimiento de procesos biológicos relacionados con la el desarrollo y diferenciación celular, la morfogénesis y la embriogénesis.

### CONCLUSIONES

El contenido de miRNAs en espermatozoides de individuos fértiles es altamente homogéneo y no muestra correlación con los parámetros seminales o la edad de los individuos. El perfil de miRNAs detectado incluye 221 miRNAs entre los que se encuentran 48 parejas estables. Las dianas de estos miRNAs están relacionadas con funciones biológicas relevantes para la fertilidad humana. Estos datos podrán ser utilizados como perfiles control de referencia en futuros estudios destinados a la evaluación de alteraciones en la expresión de miRNAs como causa subyacente de la infertilidad masculina.

### AGRADECIMIENTOS

Proyectos: PS09/00330 (FIS, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación); SGR2009-282 (AGAUR, Generalitat de Catalunya); Merck-Serono 2011FE16.

AS-H es beneficiario de una beca predoctoral PIF-UAB 456-01-1/E2010. JMM es beneficiario de una beca postdoctoral Sara Borrell CD09/00300 (Instituto Carlos III).

## P-072: ANEUPLOIDÍA Y EDAD. DGP MEDIANTE ARRAY CGH

D. Tuñón, M. Parriego, M. Boada, V. Coroleu, A. Veiga.  
 Institut Universitari Dexeus, Barcelona  
[lolitunon@gmail.com](mailto:lolitunon@gmail.com)

### INTRODUCCIÓN

Las aneuploidías cromosómicas son la principal causa de pérdidas embrionarias tempranas en los ciclos de fecundación in vitro. La implementación de la técnica de Hibridación Genética Comparada con arrays (aCGH) en célula única permite conocer la dotación cromosómica completa en los casos de diagnóstico genético preimplantacional (DGP). La selección de embriones euploides para su transferencia debe suponer una mejora en las tasas de embarazo en pacientes de riesgo o con antecedentes de fallos de implantación.

### OBJETIVO

Evaluar la asociación entre la tasa de aneuploidía y la edad materna en pacientes del programa de DGP. Determinar la probabilidad de disponer de embriones euploides para la transferencia.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo de los ciclos de DGP mediante aCGH realizados entre 2010 y 2013, sin incluir los casos de receptoras de ovocitos. En día 3 de desarrollo embrionario se realizaron las biopsias extrayendo un único blastómero de cada embrión. La amplificación del ADN de las células biopsiadas, el marcaje y la hibridación sobre arrays de CGH se realizó siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante (BlueGnome®). Los resultados se interpretaron utilizando el software específico BlueFuse Multi (BlueGnome®). La transferencia se realizó en día 5 siempre que hubiera embriones euploides morfológicamente aptos. Para el análisis de los resultados, las pacientes se clasificaron en dos grandes grupos utilizando como punto de corte los 38 años de edad en el momento de la biopsia. A continuación se realizaron 4 subgrupos según edad

materna: <35, 35-37, 38-42 y  $\geq 43$  años. Para cada uno se determinó el porcentaje de embriones euploides, la tasa de embarazo así como el porcentaje de ciclos sin transferencia. Los embriones con dotación cromosómica anómala fueron clasificados como aneuploides simples (aneuploidía en  $\leq 2$  cromosomas) o complejos (aneuploidía en  $> 2$  cromosomas).

### RESULTADOS

Un total de 816 embriones procedentes de 104 ciclos de DGP fueron biopsiados en día 3 y analizados mediante aCGH. Se observó una disminución en el porcentaje de embriones diagnosticados como euploides con la edad: 26,5% (135/509) en mujeres <38 vs 7,9% (18/228) en mujeres de  $\geq 38$  años. Esta disminución resultó progresiva, confirmándose para los distintos subgrupos: 29,1% (88/302) para <35 años; 22,7% (47/207) para 35-37 años; 9,1% (15/164) para 38-42 años y 4,7% (3/64) para  $\geq 43$  años. Se observó una distribución similar entre aneuploidías simples y complejas en los tres primeros subgrupos (52,3%, 51,9% y 56,4% de aneuploidías simples vs 47,7%, 48,1%, 43,6% de anomalías complejas respectivamente) a excepción de las pacientes mayores de 42 años en las que se detectó una incidencia superior de las aneuploidías complejas respecto a las simples (72,1% vs 27,9%). El aumento de las aneuploidías con la edad resultó en un incremento en el porcentaje de ciclos que no llegaron a transferencia por falta de embriones euploides transferibles: 24,3% (17/70) para <38 vs 67,7% (23/34) para  $\geq 38$  años. En los subgrupos se observan las siguientes tasas de no transferencia: 21,9% (9/41); 27,6% (8/29); 60,9% (14/23) y 81,8% (9/11), respectivamente.

La tasa media de embarazo por transferencia fue del 59,4% siendo según los grupo de edad estudiados de:

65,6% (21/32); 38,1% (8/21); 77,8% (7/9); 100% (2/2), sin diferencias significativas.

### CONCLUSIONES

Se confirma un incremento significativo de la incidencia de aneuploidias con la edad materna, siendo más frecuentes las aneuploidías complejas en mujeres de  $\geq 43$  años.

La selección de embriones euploides mediante aCGH neutraliza el efecto de la edad en los ciclos que llegan a transferencia.



## P-073: ¿QUÉ RELACIÓN EXISTE ENTRE LA MOTILIDAD, LOS PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS Y LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN DE LOS ESPERMATOZOIDES HUMANOS? CAUSALIDAD VS. CASUALIDAD

J. C. Martínez-Soto<sup>1,2</sup>; J Gadea<sup>2</sup>; J Landeras<sup>1</sup>

<sup>1</sup>IVI Murcia S.L., (Murcia) <sup>2</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia.

[juancarlos.martinez@ivi.es](mailto:juancarlos.martinez@ivi.es)

### INTRODUCCIÓN

La evaluación del ADN espermático es un parámetro que ha adquirido gran relevancia en los últimos años. Múltiples estudios revelan los efectos adversos que la fragmentación del ADN ocasiona en los tratamientos de reproducción asistida como pueden ser una disminución en las tasas de embarazo o una mayor incidencia en el porcentaje de abortos o bien un incremento en el número de recién nacidos con alguna anomalía.

### OBJETIVO

Evaluar la posible relación entre la fragmentación del ADN, las características seminales que se miden en un espermograma básico y los parámetros morfométricos del espermatozoide humano.

### MATERIAL Y MÉTODOS

42 pacientes en tratamiento por infertilidad en la clínica IVI Murcia S.L. fueron incluidos en el presente estudio. En una muestra seminal de cada uno de los pacientes fueron evaluados los parámetros de volumen, concentración, motilidad, morfología e índice de teratozoospermia (WHO 2010). Mediante un test Sperm Chromatin Dispersion (SCD) para determinar el grado de fragmentación de ADN (Fernandez et al., J Androl 2003). Se evaluaron los parámetros morfométricos de los espermatozoides mediante un sistema informático ISAS (Soler et al., Rev Int Androl. 2005). Se estudiaron las correlaciones de Pearson entre los parámetros espermáticos haciendo uso de SPSS.

### RESULTADOS

Al estudiar la relación entre el grado de fragmentación de ADN y los parámetros

del espermograma se observa únicamente una correlación negativa con los parámetros de motilidad, tanto la total como la motilidad progresiva ( $r=-0.74$  y  $r=-0.72$ ;  $p<0.01$ ). De manera que los espermatozoides con mayor alteración del ADN corresponden con aquellos con menor motilidad en concordancia con otros estudios previos (Zini et al., Fertil Steril 2001; Evenson et al., J Androl 2002).

Al evaluar la relación de la tasa de fragmentación de ADN con los parámetros morfométricos encontramos únicamente una correlación con los parámetros de la pieza intermedia (PI) como el porcentaje de células con PI de tamaño normal ( $r=-0.31$ ,  $p=0.05$ ), área de la PI ( $r=0.37$ ,  $p<0.01$ ), longitud de PI ( $r=0.34$ ,  $p=0.03$ ) y el ángulo de inserción de la PI ( $r=0.36$ ,  $p=0.02$ ). Este tipo de relación no ha sido descrito previamente y no encontramos una razón biológica con fundamento que explicase esta relación. Por tanto, cabría la posibilidad que esta relación estuviera justificada por una variable intermedia. De hecho al estudiar la relación existente entre estos parámetros de la pieza intermedia y la motilidad espermática total encontramos que estaban correlacionados de forma inversa a como lo estaban con la fragmentación del ADN. Porcentaje de células con PI de tamaño normal ( $r=0.38$ ,  $p=0.02$ ), área de la PI ( $r=-0.39$ ,  $p<0.01$ ), longitud de PI ( $r=-0.28$ ,  $p=0.03$ ) y el ángulo de inserción de la PI ( $r=-0.43$ ,  $p=0.01$ ). Por tanto la presencia de porciones intermedias de tamaño e implantación normal estaría relacionada con una maquinaria mitocondrial normal que generaría la energía necesaria para la correcta motilidad del espermatozoide. Sin embargo, la relación de la morfometría de la pieza intermedia con la fragmentación del ADN parece no ser causal, sino indirecta.

### CONCLUSIÓN

La motilidad espermática está estrechamente relacionada con el porcentaje de fragmentación de ADN y con los parámetros morfométricos de la pieza intermedia. Sin embargo, pensamos que la relación encontrada entre morfometría y fragmentación de ADN es una correlación indirecta debido a que las muestras seminales que presentan este tipo de características tienen su motilidad disminuida y por tanto presentan mayores roturas en sus cadenas de ADN.

## P-074: SUPERVIVENCIA DE BLASTOCISTOS BIOPSIADOS Y PREVIAMENTE COLAPSADOS CON LASER ANTES DE LA VITRIFICACIÓN

A. Delgado; L. Escrich; N. Grau; M.E. Póo; P. Buendía; A. Mercader; B. Vallejo; P. Campos; A. Galán  
 Instituto Universitario IVI VALENCIA, Valencia.  
[arantza.delgado@ivi.es](mailto:arantza.delgado@ivi.es)

### INTRODUCCIÓN

Desde la introducción de la técnica de vitrificación en los laboratorios de reproducción, los resultados en cuanto a supervivencia embrionaria post desvitrificación alcanzan niveles cercanos al 95%, cifra impensable en tiempos no muy lejanos con el proceso de congelación lenta. Aún así, el grupo de embriones del programa de Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) vitrificados post biopsia, no alcanzaba los niveles estándares esperados en el global de la vitrificación, con valores de supervivencia cercanos al 70%.

### OBJETIVOS

Mejorar de manera evidente los resultados post desvitrificación en los blastocistos euploides del grupo de pacientes de DGP colapsándolos mediante un pulso de laser minutos antes de vitrificarlos.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio descriptivo retrospectivo de un grupo de 43 pacientes pertenecientes al programa de DGP. La biopsia se llevó a cabo en día tres de desarrollo y se vitrificaron un total de 71 embriones mediante el método KITAZATO colapsados previamente con un pulso de laser OCTAX. El análisis genético se llevó a cabo mediante ARRAYS de CGH (BlueGnome) o PCR según la indicación inicial para el diagnóstico. Todos los embriones estaban en estadio de blastocisto BHi (temprano o en ocho).

### RESULTADOS

Se desvitrificaron un total de 30 embriones sobreviviendo intactos al procedimiento 29 (96,66%). Los embriones fueron incubados y evaluados a las dos horas de la desvitrificación mostrándose invariable la tasa de supervivencia tras

este periodo. Se realizaron un total de 17 transferencias con una tasa de gestación del 70%, tasa de ongoing del 53% y una tasa de implantación del 48%.

### CONCLUSIONES

El orificio realizado para la biopsia embrionaria parecía perjudicar los resultados en el proceso de vitrificación-desvitrificación de los blastocistos en cuanto a tasas de supervivencia se refiere. A pesar del escaso número de embriones incluidos en el estudio, se evidencia una tendencia hacia la mejora en los resultados post desvitrificación en este grupo de pacientes utilizando el colapso previo mediante pulso de laser. De cualquier manera, son necesarios un mayor número de procedimientos para confirmar lo que parece una mejoría evidente en nuestros resultados de laboratorio.

## P-075: CONTRIBUCIÓN DEL GAMETO MASCULINO EN LAS ANEUPLOIDÍAS EMBRIONARIAS ANALIZADO MEDIANTE ACGH

M. Martínez-Fresno<sup>1</sup>, P. Eibes<sup>1</sup>, I. Torres<sup>2</sup>; E. Gómez<sup>2</sup>, A. Urries<sup>3</sup>, S. Aisa<sup>4</sup>, E. Fernández<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Geniality Diagnóstico Genético, Madrid; <sup>2</sup>Tahe Fertilidad, Murcia; <sup>3</sup>Quiron Grupo Hospitalario, Zaragoza; <sup>4</sup>Clíca Aisa, Zaragoza  
[mmfresno@geniality.es](mailto:mmfresno@geniality.es)

### INTRODUCCIÓN

Se estima que en el 30-50% de parejas con problemas de esterilidad, la causa de es atribuible a factor masculino. Numerosos estudios avalan la relación entre una mala calidad seminal y el aumento de las aneuploidías cromosómicas en los espermatozoides, siendo estas responsables de fallos de implantación y abortos de repetición.

Las alteraciones más frecuentes, monosomías, son incompatibles con la vida y terminan en aborto, sin embargo las alteraciones numéricas que afectan a los cromosomas sexuales y las trisomías 13, 18, 21, pueden ser viables y/o compatibles con la vida. Las aneuploidías que se detectan en un FISH de espermatozoides (FISHe) alterado no equivalen a las que luego aparecen

en los embriones, sin embargo, cada vez mas estudios ponen de manifiesto que el aumento de la frecuencia de disomías en los cromosomas sexuales en espermatozoides está relacionado con un aumento en el porcentaje de embriones aneuploides y que frecuencias elevadas de espermatozoides con dotación diploide tienen mayor posibilidad de originar embriones triploides.

## OBJETIVOS

Valorar la contribución del gameto masculino a las aneuploidías presentes en los embriones de varones con FISHe alterado mediante DGP de Screening de Aneuploidías (DGPSA) por array-CGH (aCGH).

## MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio incluye a 17 parejas que presentaban un estudio de FISHe alterado. El FISHe en el varón se había indicado por: Aborto de repetición (n=2), Factor masculino (n=7), Fallo de FIV (n=5) y No referida (n=3, el FISHe se llevó a cabo en un laboratorio externo). Para evitar la posible contribución de las aneuploidías de origen materno se excluyeron de este estudio todos aquellos ciclos de DGPSA donde la mujer era >34 años. Las 17 parejas que se incluyeron provenían de 7 centros distintos y se sometieron a 21 ciclos de DGPSA, con un total de 126 embriones. Se biopsió una célula en D+3 (biopsia mecánica, láser o ácido tyrodes), y tras la lisis celular, el ADN se amplificó mediante la técnica *whole genome amplification* (Sureplex). El producto amplificado fue procesado mediante protocolo array-CGH 24sureV3 y las imágenes analizadas con el software BlueFuse (BlueGnome, Cambridge UK). Como grupo control se utilizó un estudio multicéntrico-retrospectivo presentado por Harton *et al* en el ASRM 2011, en el que se realizó array-CGH (biopsia en D+3) por edad materna avanzada y que empleó como grupo control a pacientes de 30-34 años.

## Aneuploidías/cromosoma

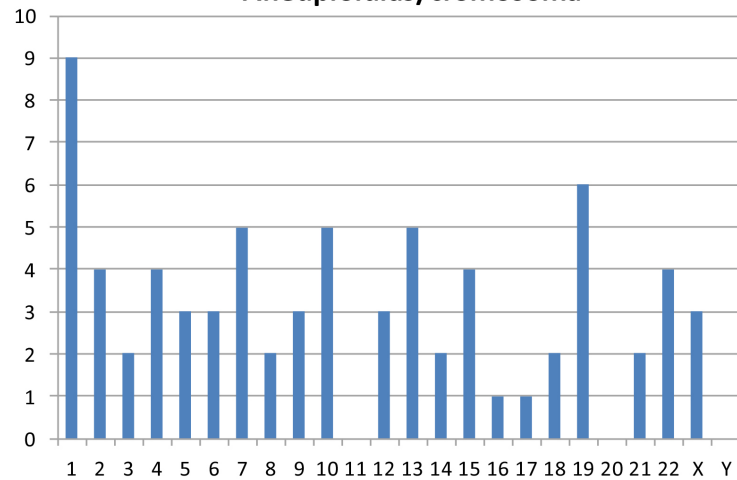


Figura 1. Nº de veces que aparece alterado cada uno de los 24 cromosomas en los embriones que presentaron  $\leq 3$  aneuploidías (n=50), estudiadas mediante aCGH 24surev3

## RESULTADOS

De un total de 126 embriones biopsiados, se obtuvo resultado en 117 (92,8%). El 29,9% de los embriones fueron diploides y aptos para la transferencia, y el 70,1% fueron aneuploides. De los 24 cromosomas se observaron aneuploidías en distintas proporciones en 21 de ellos, no detectándose en los cromosomas 11, 20 e Y (Figura 1).

Hubo transferencia en 16 ciclos (76%) de 15 pacientes, transfiriéndose un total de 24 embriones (1,5 emb./transf). Se consiguieron 7 embarazos.

La tasa de embarazo por paciente fue del 41,18% (7/17), por ciclo 33,33% (7/21) y por transferencia del 43,75% (7/16). La tasa de aborto fue del 14% (1/7) y se registró un embarazo ectópico.

## CONCLUSIONES

La tasa de embriones aneuploides de las parejas con FISHe de espermatozoides alterado es estadísticamente superior a la de un grupo control de mujeres de edad similar y sin patología (70.1% vs 50.5%). Esto sugiere que en mujeres de 30-34 años, la tasa de embriones aneuploides aumenta hasta un 20% cuando el varón presenta un FISHe alterado. Aunque no parece existir una relación entre las aneuploidías detectadas en FISHe y en el DGPSA, un resultado de FISHe alterado conferiría un mayor riesgo de aneuploidías, por lo que el DGPSA sería una indicación válida cuando el varón presenta FISHe alterado con independencia de la edad de la mujer.

## P-076: VALORACIÓN DE LA APOPTOSIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO: CORRELACIÓN CON LOS PARÁMETROS SEMINALES

G. López; R. Lafuente; J. Canals; E. Carballo; D. Rey; M. Brassesco  
CIRH, Clínica Corachán, ANACER. Barcelona, Barcelona.  
[glopez@cirh.es](mailto:glopez@cirh.es)

## INTRODUCCIÓN

El avance de las técnicas de reproducción asistida, nos lleva a

realizar diagnósticos cada vez más precisos. Hoy en día, hay un interés creciente en el valor pronóstico del test de integridad del ADN espermático.

El daño de la cromatina espermática se asocia a un aumento del riesgo de aborto espontáneo y a alteraciones en el desarrollo embrionario. Uno de los

primeros mecanismos que actúan en el daño de la cromatina espermática es la apoptosis. La Apoptosis es una compleja cascada de eventos secuenciales regulados enzimáticamente que controlan la muerte celular asociada a la fragmentación de la cromatina. La condensación nuclear y la fragmentación del ADN mediada por endonucleasas son pasos esenciales en la muerte celular por apoptosis.

#### OBJETIVOS

Correlacionar el resultado de la valoración de apoptosis y vitalidad espermática analizada mediante citometría de flujo con los parámetros seminales del análisis de la muestra en fresco.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

En estudio prospectivo se valora el índice de apoptosis y vitalidad de 126 muestras de semen y se correlaciona con los parámetros seminales (concentración y movilidad progresiva) obtenidos mediante análisis microscópico convencional. La edad media de los pacientes estudiados fue de 37.4 años.

La apoptosis y vitalidad espermática se evaluaron mediante citometría de flujo (MacsQuant, MiltenyBiotech), utilizando Anexina V-FITC (AV) y Yoduro de Propidio (IP) como fluorocromos marcadores. Las células muertas son permeables al IP y la AV se une a la fosfatidilserina cuando se externaliza en la membrana plasmática durante el proceso de apoptosis.

La correlación entre las diferentes variables se calculó mediante el test de correlación de Spearman. El análisis se llevó a cabo mediante el programa SPSS, 2.0.

#### RESULTADOS

Se observa una correlación negativa estadísticamente significativa entre la concentración espermática y el porcentaje de espermatozoides apoptóticos totales de la muestra ( $p=0.020$ ), así como con el porcentaje de espermatozoides apoptóticos vivos ( $p=0.007$ ).

En cuanto a la relación entre la apoptosis y la movilidad espermática progresiva (% espermatozoides A+B), se observó también una correlación negativa estadísticamente significativa,

tanto si teníamos en cuenta los espermatozoides apoptóticos totales ( $p=0.000$ ), como los espermatozoides apoptóticos vivos ( $p=0.000$ ).

#### CONCLUSIONES

En condiciones fisiológicas, el proceso de apoptosis mantiene el número de células germinales y evita que células espermáticas con el ADN dañado participen en el proceso de fecundación. Así pues, aquellas células dañadas, inician el mecanismo apoptótico, siendo la pérdida de movilidad, uno de los primeros pasos para prevenir la fecundación.

Parece lógico que aquellos pacientes que presentan peores resultados en los parámetros seminales presenten también mayor porcentaje de espermatozoides apoptóticos, probablemente debido a que el daño en el ADN espermático en estos pacientes también es mayor. Por esta razón, y como siguiente objetivo, nos interesa establecer cuál es el nivel de apoptosis que se puede considerar como normal para poderlo usar como test diagnóstico de valoración de la infertilidad masculina.

## P-077: RESULTADOS DEL CRIBADO PRENATAL DE ANEUPLOIDÍAS EN GESTANTES PROCEDENTES DE TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

P. Chaves Lameiro, I. Peral Camacho, MM. Vitoria Peñas, G. Fernández Valverde, JJ. Lázaro de la Osa, S. Villanueva Herriaz, A. Plaza Cubero, A. Moro Ortiz. Hospital de Valme, Sevilla  
[pao\\_chaves@hotmail.com](mailto:pao_chaves@hotmail.com)

#### INTRODUCCIÓN

En España, alrededor del 2 % de las gestaciones proceden de técnicas de reproducción asistida (TRA). Numerosos estudios muestran un aumento en la prevalencia de anomalías cromosómicas en gestaciones obtenidas mediante reproducción asistida. En el Área Hospitalaria de Valme (Sevilla) está implantado desde el año 2005, un Programa de Cribado Prenatal de Cromosopatías. Dicho programa se efectúa mediante un cribado combinado

de primer trimestre (CC1°T). El manejo correcto de estas gestaciones en los programas de cribado, mediante el uso de factores de corrección en el cálculo de riesgo, es esencial para obtener unos resultados de calidad.

#### OBJETIVO

Analizar los resultados del cribado prenatal de cromosopatías para las gestaciones obtenidas mediante TRA en el Área Hospitalaria de Valme en el periodo 2005-2011.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

El Programa de Cribado Prenatal de Cromosopatías se lleva a cabo mediante un CC1°T descentralizado en dos pasos, con determinación de Fracción Beta Libre de la Gonadotropina Coriónica Humana (BHCG) y de Proteína Plasmática A Asociada al Embarazo (PAPP-A) entre la semana 8 y 12+6 (datado por Fecha de Última Regla) y ecografía entre la semana (10+4 y 14+2) para datar la gestación mediante la longitud cráneo-caudal (CRL) y

medición de la translucencia nucal (TN). La determinación de los marcadores bioquímicos se realiza mediante un inmunoensayo quimioluminiscente en el analizador INMULITE 2000 (Siemens). La medición del CRL y TN se realiza por ecografistas formados según las normas de la Fetal Medicine Foundation (FMF) en ecógrafos Toshiba Famió (Toshiba Medical Systems Corporation) y Sonoline Adara (Siemens Medical). El cálculo de riesgo se realiza mediante el software PRISCA V4.0 (TYPOLOG). En la estimación del riesgo se emplea un factor de corrección para gestaciones procedentes de TRA integrado en el motor de cálculo. El punto de corte utilizado es 1/270 para Trisomía 21. Se calculó la tasa de detección y la tasa de falsos positivos a partir del módulo de estadísticas del PRISCA V4.0. Los diagnósticos genéticos se han realizado mediante estudio del cariotipo fetal en un laboratorio externo.

## RESULTADOS

Durante el periodo de estudio se efectuó un total de 24841 CC1T, de los cuales

993 eran gestaciones procedentes de TRA. Se diagnosticaron un total de 114 cromosomopatías: 66 Trisomías 21, 16 Trisomías 18, 4 Trisomías 13, 8 Monomías X y otras 20 anomalías cromosómicas. La prevalencia de anomalías cromosómicas fue del 0,25 % para las gestaciones espontáneas y del 0,77 % para las gestaciones obtenidas por reproducción asistida. La tasa de detección global fue del 80% para una tasa de falsos positivos (FP) del 4,6 %. En el grupo de gestaciones procedentes de TRA la tasa de detección alcanzó el 100% (FP 5,4%).

## CONCLUSIONES

1. En nuestra población, la prevalencia de anomalías cromosómicas es mayor en las gestaciones procedentes de TRA, coincidiendo con los datos que se recogen en la literatura.
2. La tasa de detección para el CC1T fue mayor en las gestaciones no espontáneas, lo cual podría explicarse, como apuntan algunos autores, al aumento de las
3. Se tendría que valorar si el aumento de la tasa de FP observado sería asumible en términos de coste-efectividad y de riesgo de complicaciones, teniendo en cuenta el mayor riesgo de aneuploidías de estas gestaciones.
4. En cualquier caso, es necesario el manejo individualizado de este tipo de gestaciones, ajustando los Múltiplos de mediana de los marcadores bioquímicos mediante el uso de factores de corrección propios, lo cual podría reducir la sobreestimación del riesgo.

## P-078: EFICACIA DE LA CRIOTRANSFERENCIA DE BLASTOCISTOS PROCEDENTES DE EMBRIONES DE MALA CALIDAD

L.M.R. Menes; F. Graña ;P. Duque; M. Pigni; V. Sánchez; J. Quintana; E. García; P.E. de la Fuente; C. García-Ochoa  
 CEFIVA, Oviedo  
[luz@cefiva.com](mailto:luz@cefiva.com)

### INTRODUCCIÓN

Dentro de una misma cohorte embrionaria existen embriones de distinta calidad, que clasificamos de acuerdo al score de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR). En nuestro centro, realizamos la transferencia embrionaria en día +2 ó +3. Los embriones no transferidos y de calidad A-B son vitrificados, mientras que los embriones de mala calidad C-D se dejan en cultivo hasta el día +4,+5 ó +6, en el que si llegan al estadio de blastocisto son vitrificados.

### OBJETIVO

El objetivo de éste estudio es evaluar la eficacia de los embriones de mala calidad en día+3 (C y D), que si evolucionan a estadio de blastocisto son vitrificados.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudian 81 ciclos de blastocistos vitrificados procedentes de embriones C-D realizados entre los años 2011-2012-

35 ciclos procedían de recepción de óvulos, 45 ciclos de ICSI, y 1 ciclo de ROPA.

Se realizaron 68 criotransferencias con 103 embriones.

El medio de vitrificación usado fue el medio Irvine, utilizando 2 soportes: abierto (Cryotop) y cerrado (CBS) que también evaluamos.

Analizamos la calidad embrionaria, porcentaje de desechados, tasa de gestación, implantación, abortos, el soporte, así como el día en que son vitrificados.



## RESULTADOS

Viabilidad de los embriones según calidad embrionaria en día +3:

Calidad embrionaria	Embriones	Transferidos	Desechados	%Desechados
C	74	60	14	18,92%
D	57	43	14	24,56%
<b>Total</b>	<b>131</b>	<b>103</b>	<b>28</b>	<b>21,37%</b>

Viabilidad de los embriones según día de la vitrificación:

Día	Embriones	Transferidos	Desechados	%Desechados
4	8	8	0	0,00%
5	93	76	17	18,28%
6	30	19	11	36,67%
<b>Total</b>	<b>131</b>	<b>103</b>	<b>28</b>	<b>21,37%</b>

Viabilidad de los embriones según soporte utilizado:

Soporte	Embriones	Transferidos	Desechados	%Desechados
Abierto	106	85	21	19,81%
Cerrado	25	18	7	28,00%
<b>Total</b>	<b>131</b>	<b>103</b>	<b>28</b>	<b>21,37%</b>

Resultados:

Técnica	Ciclos	Transferencias	Embriones Transferidos	Gestaciones	Sacos	Abortos
Receptora	35	29	47	9	14	0
Paciente	45	38	55	11	13	2
ROPA	1	1	1	1	1	0
<b>Total</b>	<b>81</b>	<b>68</b>	<b>103</b>	<b>21</b>	<b>28</b>	<b>2</b>

Técnica	Gestación/ciclo	Gestación/Transfer	Implantación	Abortos
Receptora	25,71%	31,03%	29,79%	0,00%
Paciente	24,44%	28,95%	23,64%	18,18%
ROPA	100,00%	100,00%	100,00%	0,00%
<b>Total</b>	<b>25,93%</b>	<b>30,88%</b>	<b>27,18%</b>	<b>9,52%</b>

## CONCLUSIONES

El 78,63% de los blastocistos vitrificados procedentes de embriones de mala calidad (C y D) según criterios de ASEBIR sobrevivieron a la desvitrificación y fueron transferidos, obteniéndose unas tasas de gestación por ciclo del 25,93%, de gestación por transferencia del 30,88%, y de implantación del 27,18%.

Con estos datos, podemos concluir que embriones de calidad no óptima en día +3, si evolucionan al estadio de blastocisto, son capaces de implantar con unos resultados aceptables.

## P-079: CULTIVO LARGO DE EMBRIONES SOBRAINTES CON DUDOSA CALIDAD PARA VITRIFICARSE EN D+3

V. Masedo; T. Rubio; C. Carrascosa; J. Escobar; C. López; E. López  
Hospital La Vega, Murcia.  
[ura@hospitallavega.es](mailto:ura@hospitallavega.es)

### OBJETIVO

Analizar el desarrollo de embriones sobrantes dejados en cultivo largo, procedentes de ciclos de ICSI

transferidos en día + 3, que no han sido seleccionados para transferir y que generalmente no presentan una óptima calidad para criopreservarse en ese día.

Se propone esta estrategia para estudiar la evolución del embrión hasta día +5/+6 y valorar la posibilidad de vitrificación si la calidad del blastocisto obtenido lo permite, con el objetivo

de aumentar la tasa de embarazado en estas pacientes.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo observacional realizado en la Unidad de Reproducción Hospital La Vega, Murcia. Se analizan 50 ciclos de ICSI realizados en pacientes con ovocitos propios en un rango de edad de 29 a 42 años. Quedan excluidos los ciclos de donación de ovocitos y DGP.

El cultivo embrionario se ha realizado de forma secuencial usando los medios de cultivo G1-plus y G2-plus de la marca Vitrolife en condiciones de 37°C y un 6% de CO<sub>2</sub>. Los embriones seleccionados para cultivo largo se pasaron después de realizar la transferencia en día+3 a medio G2-plus y se valoraron de forma habitual en día+5, exceptuando dos casos en los que se dejaron hasta día+6 ya que se observaron dos mórulas con buena morfología el día previo.

Se han descartado para hacer el cultivo largo embriones bloqueados en D+2/D+3, embriones con  $\leq 4$  células en D+3 y embriones con fragmentación tipo D (>35%), según criterios de ASEBIR.

Evaluamos: edad media, calidad de los embriones sobrantes, blastocistos conseguidos, blastocistos congelados, tasa de embarazo por transfer de embriones congelados y tasa de embarazo acumulado.

#### RESULTADOS

La edad media de las pacientes sometidas a cultivo largo fue de 34,9 disminuyendo a 34 años la media de aquellas que llegaron a obtener blastocistos. De los 50 ciclos analizados de ICSI se han obtenido un total de 318 embriones, de los cuales se han dejado en cultivo largo 127 embriones (40%). La calidad según criterios de ASEBIR de estos embriones en día+3, fue mayoritariamente tipo C (41%) y D (35%), también hubo un porcentaje de A (6%) y B (18%) que se prefirió dejar en cultivo ya que sólo se tenía un embrión sobrante en d+3.

De esos 127 embriones sobrantes dejados en cultivo, el 27,5% consiguió llegar al estadio de blastocisto (n=35) y se pudo congelar el 82,8%, que corresponde a 29 blastocistos con buena morfología en día+5/+6.

Hemos conseguido blastocistos en 22 de los 50 ciclos iniciales (44%). De las pacientes que vitrificamos (n=16), se ha realizado transferencia de embriones congelados en 7 ciclos obteniendo una tasa de embarazo por criotransfer del 42,8% y una tasa de embarazo acumulada del 38%. En el resto de pacientes bien se consiguió embarazo en día+3 (n=5) o están a la espera de iniciar ciclo de congelados (n=4).

#### CONCLUSIONES

Observamos que aun siendo en la mayoría de los ciclos los embriones sobrantes de calidad C y D (76%) según criterios de ASEBIR, su cultivo largo aumenta las probabilidades de éxito final en las pacientes sometidas a ciclos de ICSI.

La opción propuesta con el cultivo largo de embriones sobrantes en nuestro centro es una buena estrategia a seguir considerando que en el 44% de los ciclos se llega a blastocisto, congelando casi el 83% de embriones obtenidos, esto nos permite ofrecer la posibilidad de realizar posteriormente una transferencia de embriones congelados aumentando en estas pacientes la tasa de gestación.

## P-080: ESTUDIO DE LA MORFOCINÉTICA EMBRIONARIA TRAS EL USO DE AGONISTAS DE LA GNRH PARA LA INDUCCIÓN FINAL DE LA OVULACIÓN

E. Táboas Lima, J. Aguilar, M. Pérez, M. Ojeda, E. Muñoz.  
IVI Vigo, Vigo. Pontevedra  
[esther.taboas@ivi.es](mailto:esther.taboas@ivi.es)

#### INTRODUCCIÓN

El uso de agonistas de la GnRH (GnRH-a) para la inducción de la ovulación genera un pico de forma bifásica tanto en los niveles de FSH como de LH similar a la respuesta en ciclo natural y contraria a la generada tras la inducción con hCG recombinante (hCG-r). Además la inducción con GnRH-a presenta niveles de estradiol (E<sub>2</sub>) y progesterona (P<sub>4</sub>) menores a los obtenidos tras la inducción con hCG-r.

Sin embargo, el impacto de la inducción con GnRH-a en la cinética de división embrionaria no ha sido descrito previamente.

#### OBJETIVO

Evaluar si el uso de GnRH-a para la inducción final de la ovulación afecta a la morfocinética embrionaria en comparación con la obtenida tras el uso de hCG-r.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Desde junio del 2011 a febrero del 2013, un total de 297 embriones procedentes de 36 pacientes de nuestro programa de ovodonación fueron analizados. Las donantes fueron estimuladas mediante un protocolo con FSH (187.5 UI/día) y antagonistas de la GnRH de aplicación flexible. La inducción de la ovulación se realizó con 0.2 ml de GnRH-a (Triptorelina) en el grupo estudio (204 embriones) y 6500UI de hCG-r

(Coriogonadotropina alfa) en el grupo control (93embriones).

Tras la realización de FIV/ICSI los preembriones fueron cultivados en un incubador con tecnología time-lapse. Las variables analizadas fueron los tiempos de división temprana (TPN *faded*, T2, T3, T5), el tiempo en estado de dos blastómeras (cc2), el tiempo del paso de dos a cuatro blastómeras (s2), la calidad embrionaria obtenida según los criterios de clasificación de ASEBIR, las tasas de implantación y gestación evolutiva.

Muestras seminales procedentes de biopsia testicular, lavado seminal o muestras oligoastenoterato severas fueron descartadas del estudio. La transferencia embrionaria se realizó en D3 de vida embrionaria.

Para el análisis estadístico se emplearon test t-Student para la comparación de medias y test  $\chi^2$  para la comparación de proporciones. Un valor  $p < 0.05$  fue considerado como significativo.

## RESULTADOS

No se encontraron diferencias en la duración y calidad de la inducción. (Tabla 1)

Tampoco se encontraron diferencias significativas en la cinética celular tras la inducción con análogos. (Tabla 2)

En relación con la calidad embrionaria obtenida, el promedio de embriones transferidos fue similar en ambos grupos ( $1.46 \pm 0.78$  vs  $1.43 \pm 0.68$   $p=0.897$ ), tampoco se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de embriones de buena calidad (40.31% vs 50.06%  $p>0.05$ ), ni en las tasas de implantación (55% vs. 52.63%  $p>0.05$ ) y gestación evolutiva (60% vs 57.89%,  $p>0.05$ ).

Tabla 1

Variable	Grupo Control	Grupo Estudio	P valor
Edad donante	25.92 $\pm$ 4.75	26.87 $\pm$ 4.06	0.532
Dosis total FSH	731.27 $\pm$ 688.25	550.78 $\pm$ 557.25	0.404
Duración estimulación	8.23 $\pm$ 1.24	8.03 $\pm$ 0.67	0.585
E <sub>2</sub> día inducción	2359.25 $\pm$ 861.42	1895.61 $\pm$ 863.69	0.141
P <sub>4</sub> día inducción	1.23 $\pm$ 0.75	1.04 $\pm$ 0.57	0.420
Nº ovocitos obtenidos	13.85 $\pm$ 3.31	15.52 $\pm$ 3.96	0.206

Tabla 2

Variable	Inducción con hCG	Inducción con GnRH-a	P valor
T PN faded	26.29 $\pm$ 5.09	25.18 $\pm$ 3.55	0.062
T2	29.04 $\pm$ 5.41	28.20 $\pm$ 4.72	0.20
T3	40.19 $\pm$ 7.02	38.69 $\pm$ 5.38	0.072
T5	52.79 $\pm$ 9.72	52.38 $\pm$ 8.92	0.725
CC2	7.24 $\pm$ 7.61	8.61 $\pm$ 6.09	0.077
S2	8.25 $\pm$ 9.15	9.83 $\pm$ 9.44	0.119

## CONCLUSIÓN

La morfocinética embrionaria tras el uso de agonistas de GnRH para la inducción final de la ovulación no difiere de la obtenida en ciclos inducidos con hCG recombinante.

# P-081: ETIQUETAJE DIRECTO DE OVOCITOS Y EMBRIONES CON MICROCÓDIGOS: UN NUEVO SISTEMA PARA PREVENIR MIX-UPS EN LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

S. Novo<sup>1</sup>, C. Nogués<sup>1</sup>, O. Penon<sup>2</sup>, L. Barrios<sup>1</sup>, J. Santaló<sup>1</sup>, R. Gómez-Martínez<sup>3</sup>, J. Esteve<sup>3</sup>, A. Errachid<sup>4</sup>, J.A. Plaza<sup>3</sup>, L. Pérez-García<sup>2</sup>, E. Ibáñez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

<sup>2</sup> Department of Pharmacology and Therapeutical Chemistry and Institute of Nanoscience and Nanotechnology UB (IN2UB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. <sup>3</sup> Institute of Microelectronics of Barcelona IMB-CNM (CSIC), Bellaterra, Spain. <sup>4</sup> Institut des Sciences Analytiques (ISA), Université de Lyon, Lyon, France.

[sergi.novo@gmail.com](mailto:sergi.novo@gmail.com)

## INTRODUCCIÓN

A pesar de que los errores de identificación y complementariedad (mix-ups) de muestras reproductivas son poco frecuentes, se han documentado

varios casos en centros de reproducción asistida de todo el mundo. La correcta identificación de las muestras durante la aplicación de técnicas de reproducción asistida es primordial para reducir el riesgo de estos errores y evitar los mix-

ups. En los últimos años, nuestro grupo ha estado trabajando en el desarrollo de un sistema efectivo para el etiquetaje directo de ovocitos/embriones mediante microcodigos de polisilicio, utilizando muestras de ratón como modelo.

**OBJETIVO**

Testar la aplicabilidad y efectividad del sistema de etiquetaje directo en ovocitos y embriones humanos durante varios de los procesos a los que típicamente se someten este tipo de muestras en un laboratorio de fecundación *in vitro*.

**MATERIAL Y MÉTODOS**

Ovocitos inmaduros y maduros no fecundados (n=21) y embriones de día 1 criopreservados (n=205) fueron donados para esta investigación por pacientes de diversos centros de reproducción asistida (76 donantes). Los ovocitos/embriones fueron etiquetados mediante la adhesión a la zona pelúcida (ZP) de 10 microcódigos de polisilicio ( $10 \times 6 \times 0,5 \mu\text{m}$ ) biofuncionalizados con la lectina del germen del trigo, la cual se une específicamente a sacáridos presentes en la ZP. El desarrollo *in vitro* de los embriones etiquetados fue comparado con embriones control no etiquetados en términos de: tasas de desarrollo hasta estadio de blastocito, análisis de parámetros morfo-cinéticos mediante una plataforma de *time-lapse* (Primovision, Vitrolife), y calidad embrionaria a través de gradación morfológica y recuento celular tras

tinción diferencial (Ioduro de propidio y Hoechst) de los blastocitos producidos. La efectividad del sistema fue evaluada teniendo en cuenta la retención de los microcódigos adheridos a la ZP y las tasas de identificación embrionaria en diferentes momentos del cultivo *in vitro*, después de la vitrificación/desvitrificación y después de la inyección intracitoplasmática de ovocitos y activación partenogenética (Ionomicina y 6-Dimetilaminopurina) de los mismos.

**RESULTADOS**

Las tasas de blastocisto de embriones etiquetados (27/58) y no etiquetados (24/51) fueron equivalentes. No se detectaron diferencias significativas entre los dos grupos en la gradación morfológica, en los momentos y duraciones de los diferentes eventos morfo-cinéticos analizados, ni en el número medio de células de la masa celular interna (etiquetados:  $24,7 \pm 2,5$ ; no etiquetados:  $22,3 \pm 1,9$ ), indicando una calidad embrionaria similar. Las tasas de re-expansión después de la vitrificación/desvitrificación de blastocitos etiquetados (19/21) y no etiquetados (16/19) fueron también equivalentes.

Las tasas globales de identificación, al simular un proceso automático de lectura de los códigos, fueron del 96,9% y 89,5% en los embriones frescos (retención media de microcódigos/embrión:  $9,22 \pm 0,13$ ) y vitrificados/desvitrificados (retención media de microcódigos/embrión:  $7,79 \pm 0,35$ ), respectivamente aunque aumentaron al 100% con solo rotar los embriones durante la lectura. Solo uno de los ovocitos perdió un microcódigo durante la inyección intracitoplasmática (100% de identificación), y todos ellos mantuvieron la totalidad de los microcódigos adheridos tras la activación partenogenética.

**CONCLUSIONES**

La aplicabilidad del sistema de etiquetaje directo ha sido demostrada en ovocitos y embriones humanos. Este sistema es simple, seguro y altamente eficiente, y permite la identificación de ovocitos y embriones durante los diferentes procesos a los que se someten este tipo de muestras en un tratamiento de reproducción asistida. La aplicación de este sistema de etiquetaje permitiría reducir el riesgo de mix-ups.

## P-082: EFECTO DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO EN MUESTRAS CAPACITADAS UTILIZADAS EN CICLOS DE OVODONACIÓN

J. Pérez; M. Fors; R. Lafuente; G. López; O. Cairó; A. Brassesco; M.A. Checa; R. Carreras; M. Brassesco  
CIRH-Clinica Corachán, ANACER, Barcelona.  
[glopez@cirh.es](mailto:glopez@cirh.es)

**INTRODUCCIÓN**

En la actualidad el índice de fragmentación del ADN espermático está siendo considerado como un nuevo parámetro de calidad seminal. Suele encontrarse alterado en pacientes subfértiles y parece estar correlacionado con fallos de fecundación, embriones no evolutivos, fallos de implantación y/o abortos.

**OBJETIVOS**

En este estudio nos proponemos realizar un análisis exhaustivo de la integridad de la molécula del ADN espermático incluyendo únicamente muestras de semen fresco analizadas inmediatamente después de su uso en ciclos de ovodonación, a fin de reducir al máximo el factor femenino.

Se pretende evaluar el valor pronóstico del índice de fragmentación del ADN espermático relacionándolo con la tasa de fecundación, calidad embrionaria, bloqueo embrionario y tasa de embarazo.

**MATERIAL Y MÉTODOS**

El estudio incluye 36 parejas que han realizado tratamientos de FIV/ICSI con

ovocitos de donante. La media de edad de los pacientes masculinos es de 40,2 años.

Para el análisis de la fragmentación del ADN se ha utilizado la técnica SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) en muestras de semen fresco previamente capacitadas mediante gradientes de densidad. Se ha realizado el recuento de 5.000 espermatozoides de cada muestra mediante citometría de flujo (MACSQuantAnalyzer, MiltenyiBiotec).

Las muestras se han clasificado en tres categorías según sus valores en el índice de fragmentación: menos del 15% del ADN espermático fragmentado, entre el 15 y el 30% y, por último, más del 30%.

Se han determinado los porcentajes de fecundación por paciente y se ha considerado la calidad embrionaria evaluada el día de la transferencia siguiendo los criterios de clasificación ASEBIR (2010). También se ha determinado el porcentaje de embriones no evolutivos por ciclo. Para el estudio estadístico de la calidad embrionaria se ha realizado un análisis de covarianza multivariado (MANOVA).

Todos los cálculos estadísticos se realizaron con la versión 20.0 del programa SPSS.

## RESULTADOS

De los 36 ciclos, 23 presentan un índice de fragmentación inferior al 15% (63,8% de los ciclos) y sólo 3 de los ciclos (8,3%) presentan un índice superior al 30%. Se han obtenido un total de 212 embriones, el 46,7% de los cuales son considerados de buena calidad (A+B).

No se han observado diferencias estadísticamente significativas entre los valores de fragmentación y la tasa de fecundación ( $p=0,342$ ) y tampoco con la calidad embrionaria ( $p=0,432$ ). Respecto al bloqueo embrionario se ha estudiado la correlación entre el porcentaje de fragmentación y el porcentaje de embriones no evolutivos por ciclo ( $r=0,377$ ) obteniéndose significación estadística.

La tasa de embarazo global por paciente es del 53,1%. El grupo de pacientes con un índice menor del 15% del ADN fragmentado presenta una tasa de embarazo del 56,5%, mientras que valores del índice superiores al 30% suponen una reducción de la tasa al 33,3%. El índice de fragmentación está significativamente correlacionado con la tasa de embarazo ( $p<0,05$ ).

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran que la integridad de la molécula del ADN espermático no parece estar relacionada con la tasa de fecundación ni con la calidad embrionaria en ciclos de ovodonación. La ausencia de correlación podría ser debida a la selección de los mejores espermatozoides previa a la fecundación tras la capacitación de la muestra, a la capacidad del ovocito de reparar el daño al ADN espermático, o bien al tamaño muestral. Sería conveniente aumentar el número de casos para verificarlo.

Por otro lado, existe una correlación positiva con el bloqueo embrionario sugiriendo que valores elevados del índice de fragmentación implicarían un mayor porcentaje de embriones no evolutivos.

Finalmente, puede considerarse que el índice de fragmentación del ADN espermático es un buen indicador del embarazo tras realizarse una FIV o ICSI.

## P-083: ¿ES LO MISMO TRANSFERIR UN BLASTOCISTO QUE DOS EMBRIONES EN D+3?

A. Serra; O. Ruiz; A. Calderón; M. Belmonte; A. Múgica; M. Torres; J. Marqueta  
 Instituto Balear de Infertilidad IBILAB, Palma de Mallorca. Baleares  
[aserra@ibilab.es](mailto:aserra@ibilab.es)

### INTRODUCCIÓN

La tasa de embarazo múltiple es un importante parámetro de calidad en un laboratorio de FIV, puesto que la finalidad debe ser garantizar la máxima posibilidad de un único niño sano en casa.

Los embarazos múltiples gemelares, por frecuencia parece que hayan pasado a normalizarse, pero no dejan de ser potenciales embarazos de riesgo tanto para la madre como para los fetos.

### OBJETIVOS

Reducir la tasa de embarazo múltiple sin comprometer la tasa de éxito en los tratamientos de reproducción asistida.

Debido a la importante mejora tanto en medios de cultivo como sobretodo en incubadores, nos planteamos empezar a hacer SET en grupos muy concretos para reducir al máximo la tasa de embarazo múltiple en nuestro centro

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio retrospectivo de 147 receptoras de ovocitos en tratamiento durante 2012. Se tuvieron en cuenta 2 requisitos, tener 3 o más embriones de buena calidad (A;B según clasificación ASEBIR) y aceptar transferencia de un único embrión en d+5 (SET).

De la  $n$  total, 33 cumplían los 2 requisitos y 114 no cumplían alguno de los 2, transfiriéndose en este último grupo 2 embriones en d+3. En todos los casos los embriones fueron cultivados con medios G1(d+3);G2(d+5)



(Vitrolife, Sweden) y en el incubador EmbryoScope® (Unisense FertiTech, Denmark)

Para el análisis estadístico se utiliza el programa SPSS 15.0

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos se especifican en la Tabla 1

La tasa implantación, tasa embarazo, tasa de embarazo acumulado son similares en ambos grupos sin observarse diferencias significativas.

Como cabía esperar la tasa de embarazo múltiple es estadísticamente diferente al comparar transferencias de un único embrión frente a la transferencia de dos embriones.

Se observan diferencias significativas en el porcentaje de ciclos con congelación, pudiéndose explicar por la selección de pacientes en el grupo SET.

## CONCLUSIONES

En aquellas pacientes con un nº óptimo de embriones de buena calidad, se debería proponer la transferencia de un único embrión en D+5, eliminando la posibilidad de embarazo múltiple sin comprometer el resultado.

El alto porcentaje de ciclos con congelación en el grupo SET refuerza la decisión de transferir un único embrión y permite ofrecer más de una transferencia embrionaria a las pacientes, mejorando así la tasa acumulada por ciclo.

En nuestro centro la observación de 3 o más embriones de buena calidad en d+3 asegura transferencia en D+5.

Tabla 1

	n=33 (SET) D+5	n=114 (DET) D+3
Tasa de implantación (%)	52	40
Tasa embarazo/transfer (%)	52	59
Tasa embarazo acumulada/ciclo (%)	67	71
Tasa embarazo múltiple (%)	0*	34*
Ciclos con congelación (%)	94*	54*

\* $\chi^2 < 0.005$

## P-084: INFLUENCIA DEL DÍA DE LA TRANSFERENCIA EMBRIONARIA EN LOS RESULTADOS DE OVOCITOS VITRIFICADOS

J. Teruel, J. Herreros, N. Borges, M. Esbert, V. Mon, A. Ballesteros, M. Florensa  
IVI Barcelona, Barcelona.  
[jteruel@ivi.es](mailto:jteruel@ivi.es)

### INTRODUCCIÓN

La creación de un banco de ovocitos vitrificados para su posterior uso, se está convirtiendo en una opción cada vez más recurrente en las clínicas de reproducción asistida ya que permite mejorar la sincronización de donantes y receptoras, eliminar la lista de espera y aumentar la seguridad de la donación. Sin embargo, son necesarios más estudios que busquen optimizar la utilización de los bancos de ovocitos para ayudar a seleccionar estrategias para obtener mejores resultados.

### OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es comparar la efectividad de las transferencias de embriones provenientes de ovocitos donados y vitrificados realizadas en distinto momento del desarrollo embrionario (D+3 vs D+5).

### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio de cohortes retrospectivo de 323 ciclos de receptoras de ovocitos vitrificados incluidas en el programa de donación del IVI Barcelona (periodo entre enero 2012- marzo 2013).

Se establecieron 2 grupos: 185 receptoras en las que se hizo la transferencia embrionaria en Día+3 y 138 receptoras que se transfirieron embriones en Día+5.

La vitrificación ovocitaria se realizó utilizando el método Cryotop (Kitazato BioPharma Co.).

Los embriones fueron cultivados en medio Global Total (LifeGlobal®) y los resultados de las variables fueron comparados usando el programa estadístico SPSS (*t student*,  $P < 0.05$ ).

## RESULTADOS

De todas las variables estudiadas, se detectaron diferencias significativas en el número de embriones de buena calidad (embriones congelados y embriones transferidos) a favor de las transferencias realizadas en Día+3. En cambio, las tasas de gestación e implantación fueron estadísticamente significativas a favor de las transferencias realizadas en Día+5 (Tabla I).

## CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren que en el caso de la utilización de ovocitos de banco vitrificados, la transferencia de embriones en día 5 permite una mejor selección embrionaria y una disminución significativa en el número de embriones transferidos. Asimismo, aunque se pueda congelar un mayor número de embriones cuando la transferencia se realiza en día 3, la acentuada diferencia en las tasas de gestación e implantación a favor de las transferencias realizadas en día 5, postula una nueva estrategia para la mejora de los resultados clínicos en las pacientes sometidas a un ciclo con ovocitos vitrificados donados.

		Día de la Transferencia		
		3	5	P=
Edad	Media	41,90	42,34	0,55
	SD	4,56	4,52	
Ovocitos Donados	Media	12,72	13,17	0,53
	SD	3,94	3,77	
% Supervivencia	Media (%)	89,00	89,70	0,62
	SD	11,88	12,13	
Ovocitos Microinyectados	Media	11,26	11,73	0,72
	SD	3,78	3,47	
Fecundados	Media	8,74	9,03	0,87
	SD	3,46	3,32	
Embriones de Buena Calidad	Media	5,43	3,56	0,00
	SD	3,09	2,07	
Embriones Congelados	Media	4,63	3,05	0,00
	SD	2,89	1,97	
Embriones Transferidos	Media	1,93	1,66	0,00
	SD	0,27	0,48	
Tasa de Gestación	Media (%)	49,4	66,3	0,00
	SD			
Tasa de Implantación	Media (%)	26,36	48,92	0,00
	SD	35,79	44,83	
Tasa de Aborto	Media (%)	19,1	14,1	0,18
	SD			
Tasa de No Transferencia	Media (%)	8,0	10,3	0,09
	SD			

Tabla I. Resultado de ovocitos en función del día de la transferencia embrionaria.

## P-085: DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN TISULAR DE INTERLEUQUINAS PRO-INFLAMATORIAS EN PACIENTES CON ENDOMETRIOSIS

M. Fernández Díaz<sup>1,2</sup>, S. Atienza<sup>2</sup>, A. Gayo<sup>1</sup>, I. Arnott<sup>1</sup>, F. J. Vizoso<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>FIV4 Instituto de Reproducción Humana, Oviedo, Asturias. <sup>2</sup>Fundación Hospital de Jove, Gijón, Asturias.

[m.fernandez@fiv4.es](mailto:m.fernandez@fiv4.es)

### INTRODUCCIÓN

La endometriosis es una de las principales causas de infertilidad y se define como la presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina. Ocurre en el 10% de las mujeres en edad fértil y afecta a entre un 30 y 50% de mujeres con infertilidad.

En esta patología se ha descrito que la IL-1 $\beta$  participa en procesos inmunológicos durante el ciclo

menstrual, la IL-6 regula el crecimiento de las células endometriales y la IL-17 estimula la proliferación de las células del estroma, pero falta por determinar de forma más exhaustiva, el tipo celular, la localización y el grado de severidad de la patología en relación con este patrón alterado de citoquinas.

### OBJETIVOS

Determinar el patrón diferencial de expresión de las citoquinas

proinflamatorias, IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 en el tejido endometrial normal y en pacientes con endometriosis, y analizar la expresión según el tipo celular, la localización y el grado de severidad de la patología.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se selecciona la zona de tejido endometrial normal de 22 mujeres y los focos endometriósicos de otras 71 pacientes, diferenciándose en ováricas,

órganos pélvicos intraperitoneales y órganos fuera del aparato reproductor.

Se realizan tinciones inmunohistoquímicas para IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17. Las medidas de tinción son el resultado de la relación entre el área teñida por el anticuerpo y la no teñida multiplicado por la intensidad de la tinción, utilizando un sistema de análisis de imagen (Olympus BX51) y un software (Sofá Imaging system, Münster, Alemania).

Los resultados se someten a análisis estadístico con el paquete informático SPSS considerándose diferencias significativas entre grupos con una  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

## CONCLUSIONES

A diferencia de otros estudios realizados en líquido folicular y peritoneal, donde el papel proinflamatorio se ha mostrado como fundamental en la patología de la endometriosis, este estudio muestra una menor expresión un perfil de citoquina proinflamatorias en el tejido endometriósico.

Si bien se ha observado una expresión conjunta de las citoquinas proinflamatorias, cuando se analiza dicha correlación atendiendo a la localización y a la severidad de la endometriosis, este comportamiento generalizado no siempre se mantiene y además es independiente de la edad de la mujer.

Por tanto, el tejido sobre el cual se adhiere el tejido endometrial parece influir en la expresión de factores proinflamatorios.

Estos datos sugieren la importancia de las células del estroma en la progresión de la endometriosis en cuanto a la *down-regulation* de estas tres moléculas, permitiendo eludir la respuesta inmune y posiblemente favoreciendo así el escape inmunológico.

	Endometrio normal			Endometriosis			p
	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo	
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	128,97	52,90	224,16	89,60	0	257,01	<b>0,018</b>
<b>IL-6</b>	175,65	53,91	236,40	87,00	0	188,74	<b>&lt;0,0001</b>
<b>IL-17</b>	161,42	58,84	261,87	91,44	0	266,52	<b>0,009</b>

### Expresión global de las citoquinas

		End. Ovárica (% casos)	End. Órg. Pelv. Intr. (% casos)	End. Fuera Ap. Rep. (% casos)	p
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>CMI</b>	25,9	0	58,3	<b>0,001</b>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>Fib</b>	25,9	0	58,3	<b>0,001</b>
<b>IL-6</b>	<b>CMI</b>	60,0	0	61,5	<b>&lt;0,0001</b>
<b>IL-6</b>	<b>Fib</b>	60,0	0	61,5	<b>&lt;0,0001</b>

### Expresión según la localización.

	Endometrio normal			Endometriosis		
	CE (%)	CMI (%)	Fib (%)	CE (%)	CMI (%)	Fib (%)
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	95,5	95,5**	95,5**	83,6	24,6**	24,6**
<b>IL-6</b>	95,5	86,4*	95,5**	76,5	41,1*	41,8**
<b>IL-17</b>	100	100**	100**	81,1	54,2**	54,2**

Expresión según el tipo celular. \* $p=0,001$ / \*\* $p<0,0001$ ; CE: células epiteliales, CMI: células mononucleares inflamatorias, Fib: fibroblastos.

## P-086: VARIACIÓN DEL METABOLISMO PEPTÍDICO EN EL LÍQUIDO FOLICULAR DE MUJERES PATOLÓGICAS

C. Roméu Pérez<sup>1</sup>; M. Lierta<sup>1</sup>; A. Chueca<sup>1</sup>; C. de Bonrosto<sup>1</sup>; I. Giménez<sup>1</sup>; M. Sobreviela<sup>1</sup>; A. Urries<sup>1</sup>; I. Urizar<sup>2</sup>; H. Estomba<sup>2</sup>; L. Casis<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Grupo Hospitalario Quirón Zaragoza, Departamento de Reproducción Asistida, Zaragoza.

<sup>2</sup> Universidad del País Vasco/EHU, Facultad de Medicina y Odontología, Departamento de Fisiología, Bilbao.

[cromeu.zar@quiron.es](mailto:cromeu.zar@quiron.es)

### INTRODUCCIÓN

El líquido folicular ovárico (LF) representa un complejo compartimento funcional que integra señales endocrinas, inmunológicas y mitogénicas que lo hacen único. Las células de la granulosa producen sustancias que pueden ser valoradas en LF estableciendo diferentes parámetros de calidad. Con este propósito se ha tratado de valorar la presencia de nueve enzimas reguladoras de los niveles de diversos péptidos implicados en el metabolismo folicular en el LF de mujeres sanas e infértiles. Las peptidasas analizadas han sido: arilamidasa (PSA), aminopeptidasa-N (APN), aminopeptidasa-B (APB), dipeptidil-peptidasa IV (DPPIV), glutamil-aminopeptidasa (APA), Cistil-aminopeptidasa (Cys-AP), aspartil-aminopeptidasa (Asp-AP), prolil-endopeptidasa (PEP) y piroglutamil-peptidasa I (PGI).

### OBJETIVO

Medir la actividad de PSA, APN, APB, DPPIV, APA, Cys-AP, Asp-AP, PEP y PGI en el líquido folicular y evaluar su posible implicación en cuatro tipos de infertilidades femeninas.

Con dicho fin, se examinaron y compararon los niveles de actividad en mujeres fértiles (grupo FERT) respecto a pacientes con patologías como: síndrome de ovario poliquístico (grupo SOP), endometriosis ovárica (grupo END), factor tubárico (grupo FT) y esterilidad sin causa aparente (grupo ESCA). Posteriormente también se comparó la actividad intrapatología.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Durante la punción se recogió el LF del primer folículo aspirado. La edad del

grupo FERT fue  $28,08 \pm 4$  años (media  $\pm$  DS) (n=38), SOP (n=8), END (n=10), FT (n=15) y ESCA (n=12). Las actividades se midieron fluorimétricamente utilizando sustratos del tipo aminoacil- $\beta$ -naftilamida. El ensayo se basó en la fluorescencia de la  $\beta$ -naftilamina, generada a partir de la hidrólisis del sustrato mediante la acción de la enzima correspondiente. La longitud de onda de excitación y emisión fue 345 nm y 412 nm respectivamente. Definimos una unidad de actividad peptidasa como la cantidad de enzima que hidroliza 1 pmol de sustrato por minuto. Los resultados finales se expresaron como unidades de actividad peptidásica por litro de muestra.

### RESULTADOS

En todas las muestras de LF se detectó actividad para las nueve peptidasas estudiadas. Cuando se comparó la actividad entre el grupo FERT y las cuatro patologías se obtuvieron resultados que alcanzaron significancia estadística para PSA y APB: La enzima PSA reveló una baja actividad en el grupo FT y un aumento significativo en SOP y END ( $P < 0,05$ ). Respecto a APB, esta también mostró un decrecimiento de su actividad en FT, un incremento estadísticamente significativo en SOP ( $P < 0,05$ ) y un crecimiento en END, aunque este no alcanzó la significancia estadística ( $P = 0,07$ ). Finalmente, y tanto para PSA como APB, cuando se cotejaron las cuatro infertilidades entre sí el grupo FT mostró unos niveles de actividad significativamente inferiores a SOP ( $P < 0,01$ ), END ( $P < 0,05$ ) y ESCA ( $P < 0,05$ ).

### CONCLUSIONES

APN, DPPIV, APA, Cys-AP, Asp-AP, PEP y PGI no serían buenos indicadores de

calidad folicular ya que no muestran diferencias significativas entre el grupo de mujeres fértiles y las cuatro patologías estudiadas. El aumento significativo de actividad para PSA y APB en infertilidades como SOP o END respecto al grupo FERT o al FT podría estar asociado a un inadecuado microambiente folicular, de hecho, ambos tipos de problemas reproductivos se focalizan en el ovario.

En resumen, el metabolismo peptídico folicular se encuentra alterado en el síndrome de ovario poliquístico y en la endometriosis ovárica. Es más, PSA y APB podrían ser utilizadas como indicadores de *calidad ovocitaria*, ayudando a orientar a la paciente sobre sus posibles opciones reproductivas y permitiendo llevar a cabo tratamientos cada vez más individualizados.

**Agradecimientos:** Merck-Serono

## P-087: ¿LA TRANSFERENCIA EN BLASTOCISTOS BENEFICIA A MUJERES DE TODAS LAS EDADES? ESTUDIO PROSPECTIVO RANDOMIZADO

I. Pons, R. Cercas, C. Villas, C. Braña, S. Fernández-Shaw.  
URH Garcia Del Real, Madrid.  
[ipons@urh.es](mailto:ipons@urh.es)

### INTRODUCCIÓN

Diversos estudios sugieren que, en mujeres de buen pronóstico, la transferencia en día 5 mejora la tasa de implantación, embarazo y parto comparándola con transferencias en día 3. Generalmente se consideran mujeres de buen pronóstico las menores de 38 años con cuatro embriones en ocho células en día 3.

### OBJETIVOS

Determinar si la transferencia en día 5 comparada con la de día 3 mejora la tasa de implantación y embarazo en mujeres de todas las edades y con 4 o más cigotos.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio prospectivo randomizado a primeros ciclos de FIV-ICSI donde el día de la fecundación se observaron 4 o más cigotos (N=73). Ese día se randomizan las pacientes en dos grupos. Al Grupo 1 (N=41) se le realiza la transferencia en día 5 y al Grupo 2 (N=32) se le realiza en día 3.

Los protocolos de estimulación fueron largos o cortos dependiendo de las características de las pacientes. Uno o dos embriones fueron trasferidos y los sobrantes de buena calidad fueron vitrificados.

### RESULTADOS

No se encontraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) en las siguientes características demográficas de las pacientes: edad, duración de la esterilidad, diagnóstico, FSH y estradiol basal y conteo de folículos antrales.

El protocolo de estimulación, número de ovocitos maduros, tipo de inseminación, número de embriones transferidos (1.45 en D+5 vs 1.53 en D+3) y número de embriones vitrificados (1.9 en D+5 vs 1.8 en D+3) fueron similares en ambos grupos ( $P>0.05$ ).

La tasa de implantación, embarazo clínico y embarazo evolutivo fueron superiores en día 5 que en día 3 (45.1 vs. 30.2; 60 vs. 39.3; 50 vs. 33.3) aunque no fueron estadísticamente significativas ( $P>0.05$ ).

Al subdividir los grupos según edad de la paciente se observa que estas diferencias se mantienen tanto en menores de 38 años (63 vs. 40; 64 vs. 42.1; 50 vs 36.8;  $p>0.05$ ) como en mujeres con 38 o más años (25% vs. 21.7; 53.3 vs. 33.3; 46.6 vs 26.6;  $p>0.05$ ).

### CONCLUSIONES

Aunque las diferencias no son significativas, en todos los grupos se encuentra una tendencia a mejorar la tasa de implantación, embarazo clínico y evolutivo tras transferencia de embriones en día 5 en mujeres de todas las edades con, al menos, cuatro cigotos en día 1.

El estudio sigue en activo ya que se necesitan 305 casos en cada grupo para conseguir una diferencia significativa del 10% en tasa de embarazo.

## P-088: ¿CONSEGUIREMOS SUPLEMENTANDO CON DHA MODIFICAR LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA MEMBRANA ESPERMÁTICA Y MEJORAR LA CALIDAD SEMINAL DE PACIENTES INFÉRTILES?

C. Anarte, A. Domingo, N. Presilla, I. Calvo, JA. Agirregoikoa, G. Barrenetxea, J.L. De Pablo  
Quirón Bilbao (Bilbao)  
[canarte.bil@quiron.es](mailto:canarte.bil@quiron.es)

### INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos (AG) Omega-3 son componentes esenciales de las membranas

celulares. El ácido docosahexaenoico (DHA) se encuentra en altas proporciones en la membrana de los espermatozoides. La estructura de su membrana juega un

papel importante en la fecundación. Estos lípidos de la membrana son importantes para la fluidez y la flexibilidad de los espermatozoides.



Diversos estudios confirman la relación entre calidad seminal y composición de membrana plasmática de los espermatozoides de distintas especies de mamíferos, incluida la humana.

### OBJETIVOS

Evaluar el efecto de la suplementación con DHA sobre la composición en AG del esperma.

Evaluar las diferencias de calidad seminal antes y después de la suplementación

### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio prospectivo, aleatorizado, controlado con placebo, doble ciego en dos tipos de población: pacientes infértiles (n:90) que acudieron a nuestro centro entre septiembre 2009 y marzo 2011 y donantes de semen (n:30)

La suplementación se llevó a cabo durante 10 semanas con un complemento alimenticio a base de aceite procedente de microalga *Schizochytrium sp*, rico en DHA, administrado en forma de cápsulas.

Cada participante ingirió 2 cápsulas/12h. La composición de dichas cápsulas en el grupo placebo fue de aceite de oliva (ausencia total de DHA). En el segundo la dosis fue de 400mg DHA/día (100mg/cápsula) y en el

tercero fue de 800mg DHA/día (200mg/cápsula).

Se recogieron un total de 230 muestras de eyaculado en fresco. De las cuales 172, correspondieron a pacientes (86 basales y 86 tras la suplementación). Como grupo control se utilizaron 58 muestras correspondientes a donantes (29 basales y 29 tras la suplementación).

Las muestras se dividieron en dos alícuotas, una de ellas para determinar la calidad seminal de la muestra en fresco según criterios OMS 99 y la otra para determinar la composición en AG.

### RESULTADOS

Los pacientes presentaron valores medios inferiores para DHA y superiores para AGS que los donantes, aunque los resultados no fueron significativos, debido posiblemente a la alta variabilidad encontrada en las poblaciones estudiadas.

Tras suplementación se observó que los valores medios obtenidos en los pacientes que incorporaron tanto 400 como 800mg DHA/día aumentaban los niveles de DHA y disminuían los de AGS, pero no ocurría esto en el grupo placebo, lo que parece indicar un efecto directo de la administración exógena de DHA sobre la modificación de la composición de la membrana.

Tras el periodo de suplementación se observó un incremento significativo del porcentaje de espermatozoides con morfología normal y un aumento de la vitalidad en el grupo de los pacientes suplementados con 800mg DHA/día, alcanzando niveles similares a la morfología y vitalidad que presentaba el grupo control sin suplementar. En el resto de los parámetros espermáticos analizados no se observaron variaciones significativas tras suplementación.

### CONCLUSIONES

Los pacientes presentan un menor contenido de DHA y un mayor contenido de AGS que el grupo control.

Cuando se estudia la relación entre el DHA y la calidad seminal, esta suplementación, con 800mg/día durante 10 semanas, consigue que la morfología y vitalidad espermática de los pacientes alcance niveles equiparables a las de los donantes sin suplementar.

Para poder concretar los posibles efectos de la suplementación con DHA sobre la composición en AG y los parámetros de calidad espermática son necesarios nuevos estudios diseñados teniendo en cuenta la posible importancia de aportar dosis mayores de suplementación y periodos más prolongados de ingesta de producto.

## P-089: ANOMALÍAS CONGÉNITAS TRAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA Y SU CORRELACIÓN CON LA CALIDAD EMBRIONARIA

J. Ten<sup>1</sup>; A. A. Martínez-Bertomeu<sup>1</sup>; J. Guerrero<sup>1</sup>; J. de Juan<sup>1,2</sup>; R. Bernabeu<sup>1</sup>; F. Sellers<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Fertilidad Bernabeu, Alicante, <sup>2</sup> Cátedra de Medicina Reproductiva, Dpto. Biotecnología, Universidad de Alicante, Alicante [jten@institutobernabeu.com](mailto:jten@institutobernabeu.com)

### INTRODUCCIÓN

El uso de Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) implica una compleja manipulación de gametos, lo que plantea si éstas presentan una mayor prevalencia de defectos congénitos en los

fetos. Existe bibliografía que relaciona el uso de las TRA, más concretamente la Microinyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI), con una tasa más alta de aparición de anomalías, sobre todo aquellas que afectan al tracto genital (e. g. Hipospadias). En

las clínicas de reproducción asistida siempre se transferirán embriones que presenten una mayor calidad, siguiendo criterios morfológicos, por lo que cabe esperar que aquellos que obtengan una mejor valoración resultarán en una tasa de malformaciones menor.

**OBJETIVO**

El presente trabajo investiga la posible relación entre la calidad de los embriones, siguiendo la clasificación de ASEBIR, transferidos en ciclos de Fecundación In Vitro (FIV) e ICSI y la presencia de anomalías en los fetos.

**MATERIAL Y MÉTODOS**

Se realizó un análisis retrospectivo incluyendo todos los casos de malformaciones desde el año 1999 hasta el 2012, en los que se dio alguna anomalía en el desarrollo fetal ( $n=63$ ), comparándolos con un grupo control ( $n=544$ ) de nacimientos tras TRA desde el 2008 al 2011. Seguimos los parámetros de clasificación embrionaria de ASEBIR en cuatro categorías (A, B, C y D). Puesto que muchas transferencias fueron heterogéneas (más de un

embrión de distinta calidad) dividimos los casos en tres grupos: Calidad Alta (transferencia de embriones A-B,  $n=462$ ), Calidad Media (transferencia de combinaciones de A-C, A-D, B-C o B-D,  $n=81$ ) y Calidad Baja (transferencia de embriones C-D,  $n=64$ ). Los tres grupos se compararon estadísticamente respecto a la presencia de defectos, el tipo de anomalías, la edad materna, la incidencia de embarazo múltiple y la técnica utilizada (FIV o ICSI).

**RESULTADOS**

A pesar de la incidencia de defectos congénitos sensiblemente menor en el grupo de Alta Calidad, los resultados no muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,47$ ). Tampoco resultan concluyentes las relaciones entre la presencia de anomalías y la técnica de reproducción utilizada

( $p=0,187$ ), así como entre la aparición de malformaciones y las gestaciones múltiples ( $p=0,714$ ). Se observa, no obstante, una relación significativa entre la aparición de defectos y la edad materna ( $p=0,008$ ).

**CONCLUSIÓN**

La calidad de los embriones transferidos no supone una mayor probabilidad de aparición de defectos congénitos. Respecto a la mayor incidencia de los mismos dependiendo de la TRA usada, nuestros resultados contradicen la bibliografía consultada, que atribuye una mayor aparición tras realización de ICSI comparado con FIV. La relación existente entre la presencia de defectos y las gestaciones únicas o múltiples también es contradictoria, no así con la edad materna, la cual resulta concordante con los estudios previos.

## P-090: SISTEMA CERRADO: UNA ALTERNATIVA EFICAZ PARA LA VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS

O. Cairo; L. Prats; M. Rodríguez; A. Brassesco; F. Del Rio; M. Regincós; S. Serra; N. Correa; M. Gómez; MA. Checa; M. Brassesco.  
CIRH, Barcelona  
[ocairo@cirh.es](mailto:ocairo@cirh.es)

**INTRODUCCIÓN**

La vitrificación ha supuesto una mejora sustancial de los resultados en la criopreservación de ovocitos. Existen dos tipos de soporte, los abiertos que parecen ser más eficientes y los cerrados que parecen ser más seguros. Actualmente la mayoría de laboratorios que vitrifican ovocitos lo hacen con sistema abierto. Es necesario encontrar un sistema que sea a la vez seguro y suficientemente eficaz.

**OBJETIVOS**

El objetivo de este estudio es presentar nuestros resultados con sistema cerrado (Cryotip) y demostrar que tras una curva de aprendizaje se llega a conseguir tasas

de supervivencia similares al sistema abierto y unos valores de fecundación y división embrionaria también similares a los obtenidos con ovocitos frescos.

**MATERIAL Y MÉTODOS**

Desde enero de 2011 a abril de 2013 hemos desvitrificado 290 ovocitos de donante. Los resultados obtenidos los hemos agrupado en 3 períodos de tiempo: 1. Años 2011-12-13, 2. Años 2012-13, 3. Año 2013. Estudiamos % de supervivencia, fecundación, división embrionaria y embriones evolutivos.

Así mismo hemos comparado los resultados obtenidos entre ovocitos frescos de donante y ovocitos

desvitrificados que han sido microinyectados en ambos casos, durante el último período de tiempo, comprendido entre enero del 2013 y abril del 2013, cuando consideramos la técnica bien consolidada. Estos resultados se han analizado estadísticamente (t-Student).

La vitrificación y desvitrificación se realiza con medios Irvine y Cryotip. Para la vitrificación se decumulan los ovocitos 1 h y 30 minutos tras la punción folicular y se mantienen en Global al 20% de albúmina 1h y 15 minutos más. Seguidamente se procede a la vitrificación. Tras la desvitrificación los ovocitos se incuban en global al 20% de albúmina durante dos horas previas a la ICSI.

## RESULTADOS

	OVOS VITRIFICADOS			OVOS FRESCOS
	2011/2012/2013	2012/2013	2013	2013
Nº pacientes o casos	28	21	6	53
Ovos desvitri	290	262	77	
Ovos microiny	246 (85%)	225 (86%)	74 (96,1%)	371
Ovos fecund	162 (66%)	147 (65%)	53 (72%)*	295 (79%)*
Total embriones	155 (96%)	140 (95%)	50 (94%)**	292 (99%)**
Embriones evolutivos	123 (80%)	109 (78%)	39 (78%***)	226 (77%***)
Embarazos	14 (50%)	10 (48%)	3 (50%)	
Abortos	3	2	0	3
BQ	1	1	0	2

\* No dif. sig. P= 0.133

\*\* No dif. sig. P= 0.135

\*\*\* No dif. Sig. P= 0.186

## CONCLUSIONES

En la tabla de resultados hemos querido presentar todos los casos de desvitrificación de ovocitos de donante que hemos realizado en nuestro centro desde que iniciamos la técnica.

Si observamos los resultados globales vemos una clara curva de aprendizaje. Una vez superada, los resultados son equiparables a los obtenidos en fresco: no hay diferencias estadísticamente significativas en tasas fecundación, ni división embrionaria, ni en embriones evolutivos.

Podemos decir, también, que en el año 2013 hemos alcanzado una tasa de supervivencia del 96%, similar a la de los sistemas abiertos.

De esta forma podemos ofrecer una técnica de vitrificación ovocitaria además de segura también eficiente.

## P-091: NUEVOS INDICADORES DE CALIDAD OVOCITARIA EN EL LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA

F. Prados; I. Orozco; J. Herrero; J. Hernández; R. Buxaderas; M. de Andrés; A. Segura; J. Marqueta; J.A. Castilla.  
 Registro SEF en colaboración con ASES, ASEBIR Y SEGO. Comisión de calidad de ASEBIR. Madrid  
[inmaculadaorozcoflores@gmail.com](mailto:inmaculadaorozcoflores@gmail.com)

### INTRODUCCIÓN

Actualmente el embriólogo clínico dispone de estándares para algunos de los indicadores de Calidad del laboratorio de Embriología definidos por ASEBIR. No obstante, estos estándares sólo abarcan un bajo porcentaje de dichos indicadores.

Los indicadores de Calidad Ovocitaria fueron definidos por ASEBIR pero carecen aun de estándares. Estos indicadores recogen no sólo información cuantitativa y cualitativa, sino también el número medio de ovocitos necesario para obtener una gestación. Estos indicadores se verán influidos por el origen de los ovocitos (propios o de donante) y la técnica (en fresco o vitrificados), así como por

políticas del centro en el número de ovocitos asignados a cada receptora.

### OBJETIVOS

Con este trabajo pretendemos establecer los estándares para los indicadores de calidad ovocitaria para un laboratorio de embriología.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Para establecer los Estándares de Calidad se utilizaron los datos de Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) del Registro de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), único registro nacional sobre TRA y validado por el Ministerio de Sanidad, realizado en colaboración con ASES, ASEBIR y SEGO.

Se utilizaron los datos de aquellos laboratorios que realizaron más de 30 ciclos de FIV/ICSI en el año 2010 y se compararon con los resultados obtenidos en 2009. La técnica estudiada fue FIV/ICSI con ovocitos propios y donados.

Se definen 3 niveles para los estándares: Mínimo: aquel que consiguen alcanzar el 95% de los laboratorios que participan en el registro SEF. Deseable: aquel que consiguen alcanzar el 75% de los laboratorios. Óptimo: aquel que consiguen alcanzar el 25% de los laboratorios.

Los indicadores que se presentan son: media de ovocitos obtenidos por punción, media de ovocitos

inseminados/inyectados por punción, ovocitos obtenidos por gestación y la relación entre el número de ciclos de recepción frente al número de punciones de donantes.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos respecto a la media de ovocitos obtenidos por punción no muestran diferencias entre 2009 y 2010 tanto con ovocitos propios como con ovocitos donados. Cabe destacar que al comparar el número de ovocitos obtenidos (donados) por ciclo de recepción con respecto a los ovocitos obtenidos por punción de donante, en este segundo indicador se obtienen datos más altos, lo que

indica que aunque se obtengan mayor número de ovocitos, a las receptoras se les dan menos, probablemente porque se desechen los ovocitos no maduros (MI), vesículas germinales y ovocitos degenerados de la donante. Además, entre ambos años no hay diferencia del número de ovocitos que recibe cada receptora. Respecto al número de ovocitos inyectados por punción de donante, hay una mejoría en 2010, con valores alcanzados más altos que en 2009. Los resultados de 2009 y 2010 de los ovocitos obtenidos por gestación son muy similares, comparando por separado ovocitos propios y donados, en fresco y previamente criopreservados. Por último, la relación entre el número de ciclos de recepción frente al número

de punciones a donantes nos indica que en la mayoría de los casos, una donante será todos sus ovocitos a una misma receptora en cada ciclo.

## CONCLUSIONES

En general observamos que no hay muchas diferencias entre los dos años, lo que nos muestra que estos son unos indicadores muy estables. Las diferencias en los resultados entre ovocitos obtenidos por punción y los inseminados/inyectados por punción no son muy grandes, pero sin embargo es conveniente utilizar ambos, ya que nos da información sobre el estado de madurez de dichos ovocitos obtenidos.

## P-092: COMUNICACIÓN CELULAR ENTRE EL OVOCITO HUMANO, CÉLULAS DEL CÚMULO Y EL ESPERMATOZOIDE: ESTUDIO A NIVEL METABOLÓMICO

M.J. Gómez-Torres<sup>1</sup>; E.M. García<sup>1,2</sup>; J. Guerrero<sup>2</sup>; S. Medina<sup>3</sup>; M.J. Izquierdo-Rico<sup>4</sup>; A. Gil-Izquierdo<sup>3</sup>; J. Orduna<sup>5</sup>; M. Savirón<sup>5</sup>; J. Ten<sup>1,2</sup>; R. Bernabeu<sup>2</sup>; J. De Juan<sup>3</sup> and M. Avilés<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de Alicante, España. <sup>2</sup>Departamento de Medicina Reproductiva, Instituto Bernabeu, Alicante, España. <sup>3</sup>Grupo de Calidad, Seguridad y Bioactividad de Alimentos Vegetales, Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, CEBAS-CSIC, Espinardo (Murcia), España. <sup>4</sup>Departamento de Biología Celular e Histología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, IMIB y Campus Mare Nostrum, España. <sup>5</sup>Instituto de Ciencias de los Materiales de Aragón. CSIC-Universidad de Zaragoza, España. [mjose.gomez@ua.es](mailto:mjose.gomez@ua.es)

Las células del cúmulo juegan un papel fundamental durante la fecundación *in vivo*, por lo que cualquier alteración que afecte a su formación puede influir sobre el proceso de fecundación. Las células del cúmulo, mediante la secreción de determinadas moléculas, pueden influir en determinadas funciones espermáticas como la motilidad. Una de las moléculas secretada por estas células es la progesterona, capaz de inducir la reacción acrosómica. Esta excitosis acrosomal es necesaria para que el espermatozoide se fusione con el oolema. Trabajos previos apuntan que existen otras moléculas señalizadoras secretadas por las células del cúmulo y la matriz del ovocito que juegan un papel fundamental durante la fecundación. Por ello el objetivo de este trabajo fue analizar los metabolitos secretados por el complejo cúmulo ovocito (COC) que pudieran afectar a la reacción acrosómica y a otros procesos

fisiológicos durante la interacción y fecundación de los gametos *in vitro*. El estudio se realizó en seis pacientes incluidas en el programa de ovodonación del Instituto Bernabeu de Alicante, cuyas parejas tuvieron muestras seminales normozoospermicas aptas para FIV convencional. El análisis de los metabolitos se realizó mediante HPLC-q-TOF. En cada grupo se analizaron 18 alícuotas de medio de cultivo FM (*Fertilization Medium*, COOK®) procedente de las siguientes condiciones experimentales: a) sólo COC incubadas en medio de cultivo FM durante 3 horas previas a la inseminación; b) COC y espermatozoides capacitados en FM después de la inseminación e incubados durante 16-20 horas; c) sólo espermatozoides capacitados después de 16-20 horas en cultivo con FM y d) como grupo control sólo FM. La reacción acrosómica se evaluó en los espermatozoides capacitados de los

diferentes grupos, usando la lectina *Pisum sativum* agglutinin conjugada FITC (Isocianato de fluoresceína). Para los análisis de RT-PCR se emplearon 13 COC de tres pacientes distintas. De todos los metabolitos encontrados, once fueron detectados con un nivel de significación  $p < 0,05$ , y tres de ellos fueron identificados como Lisofosfatidilcolina (LPC), Fitoesfingosina (PHS) y Monoacilglicerol (MAG). Según nuestros resultados LPC y PHS son secretados por las células del cúmulo durante la fecundación *in vitro*. Ambos componentes podrían inducir la reacción acrosómica. De hecho, el porcentaje de espermatozoides reaccionados que estuvieron en cultivo con los COC durante las 16-20 horas de inseminación, fue de un 64 % frente a un 20 %, en aquellos que se incubaron en ausencia de COC. Además, según nuestros hallazgos los metabolitos PHS y MAG podrían

además ser liberados al medio por los espermatozoides de forma adicional tras la reacción acrosómica. Por otra parte, la expresión de los genes ACER3 (*alkaline ceramidase 3*) y hDES2 (*human sphingolipid C4-hydroxylase*) sugieren de forma contundente que las células del cúmulo contribuyen a la formación

de PHS, detectada en nuestros medios. La identificación de nuevas moléculas, con efectos paracrinos, implicadas en la comunicación celular durante la fecundación nos permitirá conocer mejor la interacción de los gametos y mejorar las técnicas de reproducción asistida.

Este trabajo ha sido subvencionado por la Conselleria de Educación de la Generalitat Valenciana (GV/2009/097, el Ministerio de Economía y Competitividad AGL2012-40180-C03-02 y FEDER y el Vicerrectorado de Investigación de la Universidad de Alicante (VIGROB-137).

## P-093: CULTIVO HASTA BLASTOCISTO DE EMBRIONES SOBRAINTES COMO INDICADOR DEL POTENCIAL IMPLANTATORIO DE LOS EMBRIONES TRANSFERIDOS

M. de las Heras, E. Martínez, G. Barrenetxea, J.L. De Pablo  
Unidad de Reproducción Asistida de Quirón Bilbao. Bilbao. Vizcaya.  
[mdelasheras.bil@quiron.es](mailto:mdelasheras.bil@quiron.es)

### INTRODUCCION

El cultivo embrionario puede ser usado como un importante indicador diagnóstico, proporcionando información útil respecto al potencial implantatorio de los embriones. La formación de blastocistos es el último estadio de la embriogénesis antes de la implantación y el cultivo embrionario hasta estadio de blastocisto proporciona un mecanismo de autoselección embrionaria. El estudio del porcentaje de formación de blastocisto puede predecir la viabilidad de los embriones y tasas de embarazo de los tratamientos fecundación in vitro.

### OBJETIVOS

Comprobar si la formación de blastocistos de buena calidad en d+5/d+6 de desarrollo embrionario a partir de embriones sobrantes, no transferidos ni congelados en d+3, puede ser utilizado como indicador de buen pronóstico en las tasas de éxito de estas pacientes que en d+3 se transfirieron embriones pero no vitrificaron ninguno y los dejaron a observación.

### MATERIAL Y METODOS

Se trata de un estudio retrospectivo analítico observacional en el cual se

incluyeron 30 pacientes que realizaron ciclos de donación de ovocitos en nuestro centro entre el año 2012 /2013. A estas pacientes se les realizó la transferencia de dos embriones de buena calidad en d+3, según los criterios de la Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR), pero no se congeló ningún embrión en estadio de células, dejando los embriones a observación y procediendo a su vitrificación en d+5/d+6 si presentaban buena calidad. Se compararon las tasas de embarazo, implantación y embarazo evolutivo entre las pacientes que vitrificaron embriones en día +5/6 (n=15) y aquellas que no vitrificaron (n=15). El embarazo clínico se determinó como una prueba positiva 14 días tras la transferencia embrionaria con latido cardíaco a las 7 semanas tras la transferencia y el embarazo evolutivo se determinó 12 semanas tras la transferencia.

### RESULTADOS

La media de ovocitos obtenidos en el grupo de pacientes que vitrificaron algún embrión en d+5/6 resultó de  $10,3 \pm 2,1$  y de  $11,5 \pm 3,8$  en el grupo en el que no se vitrificó ningún embrión. La tasa de ovocitos fecundados también fue comparable en ambos grupos ( $7,8 \pm 2,1$  vs.  $8,3 \pm 2,7$ ). La tasa de embarazo,

no teniendo en cuenta embarazos bioquímicos, en receptoras que en d+5/6 vitrificaron algún blastocisto de buena calidad resultó de un 57,1% frente a 28,6% en receptoras que no vitrificaron ninguno. La tasa de implantación fue de 32,1% frente a 14,8% y la de embarazo evolutivo de 28,6% frente a 14,8%. En ninguno de los tres parámetros se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) debido probablemente al bajo número de pacientes incluidas en el estudio.

### CONCLUSIONES

A pesar de no obtenerse diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados, se observa una clara tendencia a una mayor tasa de éxito en las pacientes que en d+5/6 tenían blastocistos de buena calidad para vitricular. Esto estaría relacionado con el proceso de autoselección de los embriones y por tanto cohortes de embriones que presentan blastocistos de buena calidad en d+5/6 serían cohortes con un grado mayor de viabilidad embrionaria que aquellas en las que ninguno de los embriones forma blastocistos de buena calidad. Es necesario incluir más pacientes en el estudio para determinar si las diferencias podrían llegar a ser significativas.



## P-094: ¿REALIZAMOS CORRECTAMENTE EL ESTUDIO DE APOPTOSIS EN MUESTRAS DE SEMEN?

A. Domingo; C. Anarte; N. Presilla; I. Calvo; E. Martínez; JA. Agirregoikoa; G. Barrenetxea; J.L. de Pablo  
Quirón Bilbao (Bizkaia).  
[adomingo.bil@quiron.es](mailto:adomingo.bil@quiron.es)

### INTRODUCCIÓN

La Apoptosis o la muerte celular programada es el proceso ordenado de muerte de una célula ante estímulos extra o intercelulares. Estudios recientes asocian la apoptosis espermática con la infertilidad masculina. Actualmente la bibliografía habla sobre la fragmentación de ADN espermático, la cual utiliza las muestras en fresco y la técnica de Tunel para determinar si una muestra es patológica ( $\geq 20\%$ ). Una de las novedades terapéuticas no invasivas en el tratamiento de la infertilidad masculina consiste en seleccionar espermatozoides no-apoptóticos mediante las columnas de Anexina V. De esta manera, logramos enriquecer la muestra con espermatozoides no-apoptóticos pero NO necesariamente libres de fragmentación de ADN. Por este motivo, vemos necesario un protocolo adecuado para el estudio de la apoptosis en las muestras de semen.

### OBJETIVOS

- 1- Estudiar la apoptosis en muestras en fresco y comprobar si se correlaciona con la apoptosis después de capacitar las muestras.
- 2- Determinar un punto de corte de espermatozoides apoptóticos para poder considerar las muestras normales o patológicas.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo observacional. Hemos analizado las muestras de semen en fresco y tras capacitar de 146 pacientes todos ellos pacientes de la Clínica de Reproducción Asistida de Quirón Bilbao. El estudio se realizó durante el primer trimestre del 2013. Los participantes se dividieron en dos grupos dependiendo del porcentaje de apoptosis de las muestras en fresco

(Grupo1:  $< 20\%$  de espermatozoides apoptóticos ( $n=68$ ) ; Grupo 2:  $\geq 20\%$  de espermatozoides apoptóticos ( $n=78$ )).

La determinación de apoptosis en las muestras en fresco y capacitado se realizó mediante Anexina V-FITC/IP y citometría de flujo.

La capacitación espermática se realizó mediante gradientes de densidad.

Para la determinación del punto de corte de espermatozoides apoptóticos se utilizaron 34 muestras de pacientes con fertilidad probada, cuyos parámetros seminales estaban dentro de la normalidad según los valores de referencia de la OMS 2010.

### RESULTADOS

Se han encontrado diferencias significativas en el porcentaje de apoptosis en las muestras en fresco y capacitado ( $p < 0,01$ ). Siendo superior el porcentaje en las muestras en fresco. Además se observa que las medias del % de apoptosis en capacitado de los dos grupos no son significativamente distintas. Por lo tanto, no podemos refutar la igualdad de media en los dos grupos, es decir el % de apoptosis en fresco no influye en el % de apoptosis del semen capacitado

Por otro lado, según el percentil 90, el porcentaje para determinar si una muestra es patológica es del 15%.

### CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que el porcentaje de **apoptosis** en muestras en **fresco no se correlacionan** con el porcentaje tras **capacitado**. Por ello, el **estudio seminal** debe hacerse tras **capacitado**, ya que, con esta muestra se realiza la TRA. De este modo, nuestro

punto de corte para una muestra patológica que debe ser filtrada mediante las columnas de Anexina V, es del **15%** y no del 20% en fresco como se refleja en la bibliografía referente a la utilización de la técnica de Tunel.

## P-095: INFLUENCIA DEL PERIODO DE ABSTINENCIA SEXUAL EN RELACIÓN CON LOS CICLOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA. RESULTADOS PRELIMINARES

M. Mundi, F. Aspichueta, M. Ferrando, Z. Larreategui  
IVI Bilbao, Leioa. Vizcaya.  
[maria.mundi@ivi.es](mailto:maria.mundi@ivi.es)

### INTRODUCCIÓN

En la actualidad se asume el periodo de abstinencia sexual recomendado por la OMS para realizar las técnicas de reproducción asistida. Sin embargo se sigue intentando relacionar su influencia con diferentes parámetros seminales y determinar el periodo más óptimo para mejorar los resultados de las clínicas.

### OBJETIVOS

Evaluar la influencia del periodo de abstinencia sexual de los varones sometidos a ciclos de RA de donación de ovocitos con los resultados en estos ciclos y los parámetros seminales.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio randomizado y prospectivo en los que participan pacientes normozoospermicos según la OMS y se dividen en dos grupos en función del periodo de abstinencia sexual: 1 día vs 3 días.

El estudio se realiza en pacientes sometidos a tratamientos de FIV/ICSI o ICSI con donación de ovocitos (entre 8 y 15 MII) para evitar la variabilidad debido al gameto femenino. La capacitación del semen se realiza con el protocolo estándar del laboratorio de FIV (Gradientes de densidad de PureSperm 90/45).

Contamos con un total de 59 pacientes en el grupo de abstinencia de 1 día; y 68 en el grupo de abstinencia de 3 días. Comenzando el estudio en Septiembre de 2012 y hasta abril de 2013.

Analizamos:

- Las tasas de gestación de los dos grupos obteniendo que en el

grupo de abs. 1 día se obtienen significativamente mayor número de gestaciones positivas.

- Comparamos 2 seminogramas de cada paciente en cada grupo (3 días de abstinencia vs 3 días)(3 días vs 1 día) y no se observan diferencias significativas entre ambos grupos.
- Estudiamos las calidades de los embriones de ambos grupos, obteniendo que no hay diferencias con respecto a las tasas de fecundación, calidad de los embriones en día 3 de desarrollo, calidades en día 5 de desarrollo o calidades de los embriones transferidos.

Realizamos análisis estadístico de los resultados de los ciclos con el programa SPSS 17.0.

### RESULTADOS

El porcentaje de gestación que presentan los dos grupos de estudios es de 76.8% para abstinencia de 1 día y del 52.40% para abstinencia de 3 días, existiendo diferencia significativa, por lo que con nuestra experiencia, la reducción del periodo de abstinencia sexual a 1 día, presenta mejores resultados que los pacientes del grupo de 3 días.

Reducir el periodo de abstinencia a 1 día no tiene influencias negativas, ya que no se han encontrado diferencias significativas en la comparación de los seminogramas de los pacientes en ambos grupos.

Para el resto de parámetros analizados comparando los resultados para abstinencia de 1 día frente a la de 3 días: tasas de fecundación (82.49% vs 79.47%), embriones calidad A transferidos (55.55% vs 52.58%),

embriones calidad B transferidos (38.14% vs 32.99%), embriones calidad C transferidos (9.27% vs 9.27%), embriones calidad D transferidos (1% vs 5%). En cuanto al total de embriones: Calidad A (22.25% vs 22.83%), calidad B (29.94 vs 31.31%), calidad C (18.71% vs 18.99%) y calidad D (29.31 vs 26.87). No encontramos diferencias significativas en ninguno de estos parámetros.

### CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren que la reducción del periodo de abstinencia mejora las tasas de embarazo en los casos de donación de óvulos. Es importante ampliar el estudio para contar con mayor número de pacientes y consolidar nuestra hipótesis. Además, realizar un estudio molecular de los espermatozoides para poder determinar si se producen cambios significativos debido al periodo de abstinencia, como se refleja en estudios anteriores.

## P-096: INFLUENCIA DE LA ELIMINACIÓN DE ESPERMATOZOIDES APOPTÓTICOS EN LOS CICLOS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CONYUGAL

M. Ballester<sup>1</sup>, M. Boada<sup>1</sup>, J.M. Vendrell<sup>1</sup>, N. Rodríguez<sup>1</sup>, B. Coroleu<sup>1</sup>, A. Veiga<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Servei de Medicina de la Reproducció, I.U. Dexeus, Barcelona. <sup>2</sup> Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona

[balmar@dexeus.com](mailto:balmar@dexeus.com)

### INTRODUCCIÓN

La separación magnética de células (MACS) mediante la anexina V conjugada con micropartículas elimina espermatozoides apoptóticos. La externalización de la fosfatidilserina en los espermatozoides apoptóticos es un marcador que nos sirve para poder detectarlos y eliminarlos de la muestra seminal. La detección se consigue gracias a la incubación de la muestra con anexina V conjugada con micropartículas de hierro y la separación se consigue al aplicarle un campo magnético. Se sabe que los hombres infértiles tienen una mayor proporción de espermatozoides apoptóticos en el eyaculado lo que tiene un impacto negativo en los resultados de las técnicas de reproducción asistida.

### OBJETIVO

Aumentar la tasa de embarazo en los ciclos de inseminación artificial conyugal (IAC) eliminando los espermatozoides apoptóticos de la muestra de semen tras procesarla mediante la combinación de gradientes de densidad (GD) y MACS.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio prospectivo de 284 ciclos de IAC intrauterina realizados durante el periodo de Junio del 2012 a Marzo del 2013 en los que de manera aleatoria, se procesaron las muestras seminales con y sin MACS. Se excluyeron aquellos casos que utilizaban muestras criopreservadas así como aquellos cuyo recuento espermático fue < 10000 espermatozoides totales post GD. La preparación de la muestra de semen en el grupo NO MACS se realizó a través de la centrifugación con GD (80% y 40%), y la fracción de espermatozoides post capacitada fue la utilizada para

inseminar. En el grupo MACS, la preparación fue la misma incubándose la fracción post capacitada con 100µl de anexina V conjugada con micropartículas de hierro. Seguidamente, se aplicó un campo magnético y se eliminaron los espermatozoides apoptóticos que quedaron retenidos en la columna (fracción anexina V-positiva). Los espermatozoides de la fracción anexina V-negativa (no apoptóticos) que se recuperaron por depleción fueron los que se utilizaron para la inseminación. Las variables cualitativas o nominales se compararon mediante el Test Chi-cuadrado o el Test exacto de Fischer y las variables continuas se compararon mediante la U-Mann-Whitney.

### RESULTADOS

De los 284 ciclos estudiados, 115 (40.5%) fueron NO MACS y 169 (59.5%) MACS no presentando diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la edad media del varón ( $36.79 \pm 4.67$  vs  $36.60 \pm 4.38$  años) ni al conteo de espermatozoides móviles progresivos inseminados ( $29.74 \times 10^6 \pm 52.75$  vs  $25.77 \times 10^6 \pm 32.95$ ). Tampoco presentaban diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la edad media de la mujer ( $35.05 \pm 3.38$  vs  $34.73 \pm 3.40$  años) ni a sus características ginecológicas: FSH ( $6.79 \pm 1.87$  vs  $6.95 \pm 2.72$  U/l), Estradiol ( $58.39 \pm 41.55$  vs  $46.21 \pm 19.96$  pg/ml), número de inseminaciones previas ( $0.73 \pm 0.88$  vs  $0.72 \pm 0.87$ ) y dosis de gonadotropinas ( $511.57 \pm 327.36$  vs  $536.42 \pm 358.16$  UI). Se obtuvieron 19 embarazos en el grupo NO MACS y 34 embarazos en el grupo MACS, siendo la tasa de embarazo de 16.5% y 20.1% respectivamente sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Actualmente, la tasa de aborto es de 10.5% vs 8.8%

sin diferencias estadísticamente significativas y habiendo aún 44 embarazos en curso.

### CONCLUSIONES

Se observa una tendencia a la mejora en los resultados cuando se procesan las muestras de semen mediante MACS para eliminar los espermatozoides apoptóticos aunque la diferencia entre las tasas de embarazo obtenidas en ambos grupos no sea estadísticamente significativa.

Para tener resultados más concluyentes, se necesitaría aumentar el número de casos estudiados así como llevar a cabo estudios randomizados.

## P-097: VALOR DIAGNÓSTICO DEL FISH EN ESPERMATOZOIDES: VARIABILIDAD INTRAINDIVIDUAL E INTERINDIVIDUAL EN LA FRECUENCIA DE ANEUPLOIDÍAS DE ESPERMATOZOIDES EN VARONES CON FERTILIDAD PROBADA

P. Eibes<sup>1</sup>; S. Cortes<sup>2</sup>; E. Sánchez<sup>1</sup>; M. Martínez-Fresno<sup>1</sup>; R. Nuñez<sup>2</sup>; E. Fernández<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Geniality Diagnóstico Genético, Madrid; <sup>2</sup>Clínica Tambre, Madrid

[paulaeibes@geniality.es](mailto:paulaeibes@geniality.es)

### INTRODUCCIÓN

Las aneuploidías constituyen una de las anomalías cromosómicas más habituales y graves transmitidas por los gametos, que afectan a los embriones humanos. Mientras que en el ovocito está ampliamente aceptado que el riesgo de aneuploidías aumenta con la edad materna, en el caso de los espermatozoides, existen factores que apuntan a un incremento el riesgo de producir espermatozoides aneuploides, como la edad, tratamientos de quimioterapia y ciertos estilos de vida, sin embargo son pocos los estudios que determinan si existe variabilidad intraindividual en las frecuencias de aneuploidías o por el contrario estas son constitucionales.

### OBJETIVOS

Estudiar mediante FISH de 5 cromosomas, la variabilidad genética intraindividual e interindividual analizando la frecuencia de aneuploidías en espermatozoides en un grupo de donantes de semen con fertilidad probada.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Para el análisis de la variabilidad intraindividual e interindividual, se han recogido tres muestras de semen de 10 donantes de fertilidad probada (21-35 años), durante un periodo de tres meses, con un intervalo de un mes entre ellas.

Para el análisis de FISH de espermatozoides (FISHe), las muestras se procesaron mediante el protocolo modificado de Moskovtsev. Tras la hibridación (AneuScore XA 13/21 + XA

X/Y/18), valoramos la frecuencia de aneuploidías (disomía, hiperploidía y diploidía) en cada cromosoma estudiado (2.000 espermatozoides/muestra).

Para comparar los resultados en la frecuencia de aneuploidías entre las muestras de un mismo individuo (variabilidad intraindividual) se empleó un test de  $\chi^2$  ( $P \leq 0.05$ ). La variabilidad interindividual se analizó comparando la media de la frecuencia obtenida para cada tipo de aneuploidía entre los 10 donantes, así como entre grupos de diferentes rangos de edad (21-25 años; 26-30 años; 31-35 años).

### RESULTADOS

Tanto en el análisis intra como interindividual, todas las frecuencias de aneuploidías descritas se encuentran dentro de los valores normales de la población control de Geniality y/o las descritas en la literatura.

En el análisis intraindividual, no existen diferencias significativas para ninguno de los cromosomas analizados al comparar la frecuencia de aneuploidías entre las muestras de un mismo donante, exceptuando un donante, que presentó diferencias significativas en la frecuencia de disomía para el cromosoma 21 entre dos de sus tres muestras (0,4%vs0%).

El análisis de la variación interindividual del total de muestras, muestra una heterogeneidad en las frecuencias de aneuploidías, que fue estadísticamente significativa en tres casos para la hiperploidía XY. Cuando se realiza una estratificación por edad en la variación interindividual, existe un incremento no significativo en la disomía del

cromosoma 13 en el individuo de mayor edad respecto al de menor edad. Existen diferencias significativas en la frecuencia de espermatozoides diploides 13/21 en el grupo de mayor edad.

### CONCLUSIONES

El análisis de las variaciones intraindividuales pone de manifiesto que las aneuploidías pueden ser constitucionales y que no varían los valores de normalidad en un mismo individuo si no existe un factor externo que produzca un cambio en su frecuencia, como esta publicado en la literatura (Tempest *et al.*,2009). En el análisis interindividual las diferencias significativas en la hiperploidía XY se pueden explicar por el intervalo de confianza ya que es una de las disomías sexuales más frecuentes en el FISHe.

Al comparar los grupos por edades se observan diferencias significativas en la diploidía 13/21, por lo que la edad si puede constituir un factor que afecte a la tasa de aneuploidías en un mismo individuo a lo largo del tiempo.

Estos resultados avalan el FISHe como una prueba diagnóstica complementaria válida en el estudio del varón en la pareja estéril y justifican la indicación de DGP de Screening de Aneuploidías, en aquellos casos con frecuencias de aneuploidías incrementadas respecto a los valores de la población control.

## P-098: SUCESIVAS VITRIFICACIONES NO AFECTAN A LA VIABILIDAD DEL EMBRION

B. Migueles, M. Hebles, M. González, M. Dorado, L. Aguilera, A. Fernández, P. Sánchez, F. Sánchez  
Clínicas Ginemed, Sevilla  
[bmigueles@ginemed.es](mailto:bmigueles@ginemed.es)

### INTRODUCCIÓN

La mejora en criopreservación embrionaria obtenida a partir del año 2007 gracias a la introducción de la vitrificación, supuso un mayor rendimiento en los ciclos de FIV-ICSI. Sin embargo, la posibilidad de criopreservar un embrión más de una vez con un resultado satisfactorio era impensable hace algunos años. Diferentes grupos con experiencia en vitrificación han obtenido resultados satisfactorios en ciclos de óvulos vitrificados de los que se han obtenido embriones en estadio de blastocisto que se han criopreservado en día +5 para ser transferidos posteriormente, logrando una total supervivencia tras el warming.

### OBJETIVOS

Ver los resultados obtenidos en ciclos donde los embriones se han vitrificado en más de una ocasión, tanto en tasas de supervivencia como de embarazo.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizan un total de 34 ciclos de FIV-ICSI donde se vitrificaron los embriones evolutivos que no fueron transferidos se criopreservaron. La criopreservación se realizó mediante el método de vitrificación descrito por Kuwayama (2007). Los embriones fueron descongelados para una segunda transferencia donde se volvieron a vitricular los embriones evolutivos restantes. Veremos las tasas de

supervivencia y embarazo en pacientes cuyos embriones fueron descongelados por una tercera vez.

### RESULTADOS

Las tasas de supervivencia para embriones sometidos a 3 ciclos de criopreservación fue de un 84.1%, donde se hicieron un total de 34 transferencias, obteniendo una tasa de embarazo del 47.05%.

### CONCLUSION

El empleo de la vitrificación como método de criopreservación embrionaria y los excelentes resultados obtenidos nos permite obtener un mayor rendimiento de los ciclos de FIV-ICSI.

## P-099: ¿ES NECESARIA UNA GUÍA ESPECÍFICA PARA EVALUAR ESTUDIOS DE CALIDAD SEMINAL?

J.A. Castilla Alcalá; A. Clavero; M. Serrano; I. Orozco; A. Mantilla; M. Rodríguez; B. Leña; S. Carrillo.  
Unidad de Reproducción del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.  
[josea.castilla.sspa@juntadeandalucia.es](mailto:josea.castilla.sspa@juntadeandalucia.es)

### INTRODUCCIÓN

Gran parte de la controversia existente sobre el declive de la calidad seminal en las últimas décadas, es provocada por una falta de estandarización en la metodología de los estudios de calidad seminal. Recientemente se ha publicado una nueva lista de verificación (checklist) cuya singularidad es su adecuación a las características particulares de los estudios de calidad del semen, SEMQUA, al contrario que otros checklist de ámbito más general para estudios observacionales como STROBE.

### OBJETIVOS

Nuestro objetivo es comparar la utilidad de SEMQUA y STROBE en la evaluación de la calidad de estudios de calidad seminal utilizando para ello estudios sobre exposición ocupacional y ambiental a pesticidas persistentes.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Tras una extensa búsqueda bibliográfica en PubMed utilizando las palabras clave "sperm and pesticide" se encontraron 1012 trabajos, se descartaron los estudios en animales,

en habla no inglesa, revisiones y artículos de opinión, estudios que no trataban sobre pesticidas, los que no realizaban un análisis de semen o no trataban sobre calidad seminal y aquellos en que la exposición a pesticidas era no persistente. 36 trabajos cumplieron los criterios de inclusión del estudio. Tras una amplia revisión de la bibliografía se incluyeron 10 trabajos más. Un total de 46 artículos fueron analizados.

Todos los artículos revisados evaluaban la relación entre la exposición a pesticidas persistentes y



la calidad seminal, 57% (26) de ellos tratan sobre exposición ocupacional y 43% (20) sobre exposición ambiental.

Los artículos fueron evaluados por dos personas aplicando las guías STROBE y SEMQUA y el grado de acuerdo entre ellos se midió utilizando el estadístico Kappa.

## RESULTADOS

Respecto a SEMQUA, la media del grado de cumplimiento de los 28 estándares aplicados fue del 47,0% ± 18,5%, para STROBE la media del grado de cumplimiento de los 32 estándares aplicados fue del 43,1% ± 11,6%.

Aunque no se encuentran diferencias significativas entre el grado de cumplimiento de SEMQUA y STROBE de manera global si se observan cuando se consideran sólo ítem de aspectos metodológicos. Se obtiene un mayor grado de cumplimiento de los aspectos metodológicos utilizando SEMQUA que con STROBE (48,4 ± 21,0 vs 39,5 ± 17,4;  $p < 0.001$ ).

Hemos observado un aumento en el grado de cumplimiento general de SEMQUA ( $r = 0.61$  y  $p < 0.001$ ) y STROBE ( $r = 0.45$  y  $p < 0.01$ ) a lo largo de los años. Al observar ítem exclusivamente metodológicos este aumento sólo es significativo para SEMQUA ( $r = 0.61$  y  $p < 0.001$ ).

## CONCLUSIONES

El bajo grado de cumplimiento observado es coincidente con lo observado en otros trabajos sobre medicina reproductiva y pone de relieve la necesidad de mejorar el diseño de los estudios sobre calidad seminal. El desarrollo de checklist específicos para cada campo es fundamental. SEMQUA ha demostrado ser una herramienta más específica para el campo de la calidad seminal que STROBE. Es fundamental que editores, revisores y autores conozcan y apliquen SEMQUA a la hora de evaluar artículos sobre calidad seminal.

# P-100: ESTUDIO DE ANEUPLOIDÍAS EN BLASTÓMERAS AISLADAS MEDIANTE BIOPSIA EMBRIONARIA TRAS SER CULTIVADAS EN EMBRYOSCOPE DURANTE 24H

L. Muriel<sup>1,2</sup>; H. Ghevaria<sup>3</sup>; J. Harper<sup>3</sup>; A. Thornhill<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> King's College Hospital NHS Foundation Trust. London. UK. <sup>2</sup> London Bridge Fertility Centre. London. UK. <sup>3</sup> Institute for Women's Health. University College London. UK. <sup>4</sup> St Guy's and Thomas Hospital NHS Foundation Trust.

[lourdesmuriel@hotmail.com](mailto:lourdesmuriel@hotmail.com)

## INTRODUCCIÓN

Anomalías genéticas en embriones humanos pueden resultar en fallos de implantación, abortos o defectos en el recién nacido. Se ha descrito que hasta un 80% de los embriones portan células aneuploides, fenómeno conocido como mosaicismo. El estudio de mecanismos que originan aneuploidías es de gran importancia para entender el desarrollo embrionario y las causas de dichas anomalías genéticas. Una forma de estudiar el origen de aneuploidías postzigóticas es el cultivo y análisis de blastómeras aisladas, por su potencial de desarrollo in vitro.

## OBJETIVOS

Determinar el potencial de división de blastómeras aisladas mediante biopsia embrionaria e identificar errores postzigóticos en las células resultantes tras 24h de cultivo. Estimar la tasa de

aneuploidía y mosaicismo embrionarios y su relación con el género del embrión.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Diecisiete embriones fueron biopsiados en estadio de 2-4 células. Se aislaron un total de 63 blastómeras que fueron cultivadas individualmente durante 24h en EmbryoScope. Las células resultantes tras la división se analizaron mediante hibridación in situ fluorescente (FISH) para el estudio de los cromosomas X, Y, 18, 13 y 21. El proyecto se realizó en la clínica London Bridge y University College London (junio-septiembre 2012).

## RESULTADOS

Las blastómeras mostraron un gran potencial de división, siendo un 72,1% (44/61) la proporción de células divididas tras una media de 11,5h. Cerca del 90% (15/17) de los embriones

contenían al menos una célula dividida en dos células hijas.

El error postzigótico más común encontrado fue la pérdida cromosómica (CL) (90,1%; 20/22) en comparación con ganancia cromosómica (CG) (9,1%; 2/22). Sin embargo, no se registró ningún evento de no-disyunción.

La tasa de embriones uniformemente diploides para los cromosomas analizados fue 41,1% (7/17), mientras que la tasa de mosaicismo fue 52,9% (9/17). La proporción de embriones uniformemente aneuploides fue sólo de un 5,5% (1/17), lo que confirma que errores meióticos son menos comunes que los mitóticos.

La proporción de anomalías cromosómicas en células no divididas fue mayor que en células divididas tras cultivo, aunque la diferencia no fue significativa ( $p = 0.166$ ). Las

blastómeras euploides y aneuploides no mostraron diferencias significativas en cuanto al tiempo necesario para la división ( $p=0.745$ ). En cuanto al género de las blastómeras, no se observaron diferencias significativas entre blastómeras XX y XY con respecto al nivel de aneuploidía ( $p=0.246$ ) ni con el tiempo necesario para completar citoquinesis ( $p=0.395$ ), aunque las blastómeras XX mostraron tendencia a ser más lentas (12,1h vs 10,9h).

### CONCLUSIONES

A pesar de las limitaciones del estudio debido al bajo número de embriones

incluidos y cromosomas analizados, se puede concluir que las blastómeras aisladas poseen una elevada tasa de división tras cultivo in vitro, siendo idóneas para el estudio de mecanismos que originan anomalías cromosómicas postzigóticas en embriones humanos. La pérdida cromosómica parece ser el evento más habitual en el origen de aneuploidías, seguido de la ganancia cromosómica.

El hecho de que las blastómeras euploides y aneuploides estudiadas no presenten diferencias significativas en cuanto al tiempo necesario para la citoquinesis, no justifica el uso de incubadores time-

lapse para la detección de aneuploidías, hecho que podría deberse a efectos opuestos de diferentes anomalías en la división celular. Sin embargo, la sincronía en el proceso de citoquinesis en todas las blastómeras de un mismo embrión, parece estar relacionado con la probabilidad de ser euploide, lo que puede tenerse en cuenta como marcador de buena calidad embrionaria.

Estudios incluyendo un mayor número de embriones y un análisis genético más exhaustivo, podrían ayudar a elucidar los patrones de segregación cromosómica y su efecto en embriones humanos.

## P-101: RESULTADOS PRELIMINARES PARA UN BANCO DE OVOCITOS DE DONANTE

D. Gumbao, A. Sánchez-León, J. Marcos, B. Amorocho, M. Mollá, L. Fernández, M. Nicolas, J. Landeras  
IVI Murcia. Murcia. Spain  
[david.gumbao@ivi.es](mailto:david.gumbao@ivi.es)

### INTRODUCCIÓN

El desarrollo de las técnicas de vitrificación ha permitido mejorar la tasa de supervivencia tanto ovocitaria como embrionaria respecto a técnicas de congelación anteriores permitiendo que hoy en día podamos contar con bancos de ovocitos de donante funcionales. Por tanto, la vitrificación de ovocitos humanos de donante, al margen de las ventajas éticas y legales frente a la crio-conservación embrionaria, aporta buenos resultados clínicos y además facilita la correlación entre las características físicas y sanguíneas de donante y receptora ("matching") sin necesidad de largas listas de espera.

### OBJETIVOS

El objetivo fundamental del trabajo fue evaluar los resultados preliminares obtenidos con nuestro banco de ovocitos de donante y su sistema de "matching" donante-receptora, valorando la viabilidad y calidad de los resultados obtenidos con el fin de conocer la funcionalidad de nuestro banco y de esta manera poder optimizar al máximo su rendimiento.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se han analizado retrospectivamente 51 tratamientos de ovodonación, llevados a cabo en 2012, que incluyeron 654 ovocitos vitrificados-desvitrificados procedentes de nuestro banco de ovocitos de donante. 24 de las muestras de ovocitos (grupo A) fueron traspasadas a otros centros del mismo grupo en un tiempo máximo de 24h, asegurando las mejores condiciones de crio-preservación posibles. Los resultados obtenidos fueron comparados con otros 27 ciclos llevados a cabo a partir de ovocitos desvitrificados en nuestra propia clínica (grupo B) con el fin de comprobar si existía alguna diferencia.

Las diferencias fueron analizadas estadísticamente mediante software informático (SPSS 15.0 Inc., Chicago, IL, USA) para  $p < 0.05$ .

### RESULTADOS

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros analizados: % de supervivencia ovocitaria (grupo A: 91.2%

vs grupo B: 91.3%), % de embriones de calidad óptima (grupo A: 49.8% vs grupo B: 52.1%), tasa de gestación clínica (grupo A: 66.7% vs grupo B: 73.1%) y tasa de implantación (grupo A: 52.9% vs grupo B: 58.3%). Algo más ajustadas fueron las diferencias en cuanto a tasa de fecundación (grupo A: 82.3% vs grupo B: 77.0%  $p=0.11$  y aborto clínico (grupo A: 12.5% vs grupo B: 31.6%  $p=0.19$ ) aunque sin ser significativas igualmente.

### CONCLUSIONES

Gracias a los conocimientos y las nuevas técnicas de crio-preservación que hemos ido desarrollando y aplicando en nuestras clínicas, basadas fundamentalmente en la vitrificación ovocitaria, podemos contar con bancos de ovocitos funcionales que satisfagan la demanda entre nuestros diferentes centros además de optimizar la relación donante-receptora en un menor periodo de tiempo. No obstante, sigue siendo necesario un control y revisión continuado del programa integral de gestión, así como de las estrategias y estudios que puedan ayudar a una mejora constante del mismo.

## P-102: BIOPSIA QUÍMICA VS MECÁNICA. TASAS DE GESTACIÓN

S. Aísa; E. Carretero; J. L. Gámez.

Aísa Reproducción. Zaragoza. Zaragoza.

[sofia.aisa@aisafiv.com](mailto:sofia.aisa@aisafiv.com)

### INTRODUCCIÓN

El Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) está adquiriendo cada día más relevancia a la hora de elegir los mejores embriones en los ciclos FIV-ICSI. Dicha técnica es invasiva para los embriones, por tanto debemos intentar optimizarla en la medida de lo posible para causar el mínimo impacto sobre éstos a la hora de manipularlos para realizar los estudios genéticos, intentando conseguir así embriones viables y de mayor calidad.

### OBJETIVO

El objetivo del estudio consiste en comparar los porcentajes de éxito de embarazo en ciclos con embriones analizados mediante DGP haciendo distinción entre los embriones biopsiados químicamente, valiéndonos de ácido Tyrodes, y los biopsiados mecánicamente mediante la utilización de un punzón.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio retrospectivo sobre 28 ciclos con DGP realizados en la clínica desde el 2006 hasta abril del 2013.

Los ovocitos recuperados fueron decumulados enzimática y mecánicamente, y fecundados mediante ICSI. Durante la decumulación enzimática fueron expuestos a Hilonidasa (LifeGlobal) y bombeados con pipetas Pasteur de vidrio estiradas a la llama y posteriormente con microcapilares de 130µm. La fecundación fue comprobada tras 16-19 horas postmicroinyección. Todos los embriones fueron cultivados hasta el día +3 (a 37°C y 5'8% de CO<sub>2</sub>) (Global TOTAL, LifeGlobal) para ser biopsiados a las 69-72 horas tras su fecundación.

Los embriones de los primeros 18 ciclos fueron biopsiados con la utilización

de ácido Tyrodes (MediCult). En los 10 ciclos siguientes, los embriones fueron biopsiados mecánicamente utilizando un punzón de biopsia (PZD-30, Humagen). Solo los embriones con 6 o más blastómeras fueron biopsiados. Las blastómeras fueron enviadas para ser analizadas a una empresa externa especializada en DGP.

Para comprobar el éxito de embarazo se realizó a las pacientes el análisis en sangre de la β-HCG a los 14 días de la transferencia embrionaria.

### RESULTADOS

### CONCLUSIONES

	Número de ciclos	$\bar{X}$ edad pacientes	$\bar{X}$ embriones transferidos	β-HCG +	β-HCG -	Tasa de embarazo
Biopsia química	18	34,8	2,5	7	11	38,9%
Biopsia mecánica	10	40,2	2	6	4	60,0%

A la vista de los resultados reflejados en la tabla 1, podemos intuir que la punción mecánica es menos perjudicial para el embrión, esto se refleja en un aumento del 21,1% en la tasa de embarazo con el uso de la biopsia mecánica respecto de la biopsia química. Así pues, podemos deducir que los embriones están sometidos a un mayor estrés cuando son biopsiados químicamente debido al ambiente ácido que creamos en su manipulación.

Cabe destacar que la media de edad de las pacientes, cuyos embriones fueron biopsiados mecánicamente, es superior a la de las pacientes cuyos embriones fueron biopsiados químicamente. Además, el número medio de embriones transferidos tras biopsia mecánica fue inferior que tras biopsia química. Por tanto, estos datos dan aún más valor al incremento en la tasa de embarazo tras una biopsia mecánica para un análisis de DGP.

## P-103: COMPARATIVA DE PARÁMETROS DE CALIDAD EMBRIONARIA Y RESULTADOS CLÍNICOS ENTRE EMBRIONES OBTENIDOS POR MICROINYECCIÓN CON Y SIN PVP EN MISMA COHORTE EMBRIONARIA RESULTANTE DE CICLOS DE DONACIÓN DE OVOCITOS

C. López-Feijoo, D. Agudo, E. Huguet, M. Alonso, M. Martínez, M. Gaytan  
IVI Madrid, Aravaca, Madrid.  
[carlos.lopez@ivi.es](mailto:carlos.lopez@ivi.es)

### INTRODUCCIÓN

El empleo de Polivinil Pirrolidona (PVP) en el ICSI para ralentizar la movilidad y facilitar la selección espermática es el procedimiento más habitual en los laboratorios de Reproducción Asistida.

La PVP es un polímero de elevado PM (360 kDa) cuyos monómeros son tóxicos pero polimerizados son extremadamente estables.

Desde hace tiempo se ha especulado con los efectos deletéreos de la PVP pero pocos son los estudios al respecto.

### OBJETIVOS

Valorar la influencia de la PVP en los resultados clínicos y parámetros de calidad embrionaria.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Los casos incluidos son ciclos de donación de óvulos con donantes estimuladas mediante protocolo con antagonista de la GnRH y empleando gonadotropina recombinante e inducción a ovulación con agonistas de GnRH.

Diseñamos un estudio prospectivo y ciego en el cual se dividen en dos grupos los ovocitos en ciclos de donación ovocitaria, uno de los grupos se hace ICSI convencional y en el otro grupo se microinyectan los ovocitos sin PVP.

**GRUPO 1 :** Se realiza la microinyección con PVP de modo convencional, empleamos para la realización de las placas Global® Total® for Fertilization.

**GRUPO 2 :** Los espermatozoides, una vez seleccionados en una gota de PVP,

	GRUPO 1 GRUPO CONTROL	GRUPO 2 GRUPO HIPÓTESIS	TRANSFER MIXTO	P
<b>FECUNDACIÓN</b>	82,40% 501/608	81,40% 443/544		Ns
<b>DEGENERADOS</b>	6,70% 41/608	7,90% 43/544		Ns
<b>EMB 1ª CATEGORÍA</b>	47,50% 238/501	49,20% 218/443		Ns
<b>% DE BLASTOCISTOS DE BUENA CALIDAD EN EMB DE OBS.</b>	25,38% 33/130	25,75% 26/101		Ns
<b>GESTACIÓN</b>	64,50% 20/31	58,33% 21/36	59,60% 31/52	Ns
<b>GESTACIÓN CLÍNICA</b>	58% 18 /31	50% 18/36	58,76% 29/52	Ns
<b>IMPLANTACIÓN</b>	41,60% 25/60	38% 24/63	40,38% 42/104	Ns
<b>ABORTO CLÍNICO</b>	7,40% 2/27	11% 4/36	11,5 % 6/52	Ns

son trasladados a una gota de medio de cultivo Global® Total® donde son lavados al igual que la pipeta de microinyección a lo largo de varias gotas de medio de cultivo, después se aspira el espermatozoide con medio de cultivo limpio y se procede a la microinyección por técnica convencional.

**GRUPO MIXTO:** Formado por transferencias que tienen un embrión de cada uno de los grupos de estudio.

En día 3 se seleccionan los embriones para transferencia basándose en características morfológicas, la elección del embriólogo es ciega respecto al grupo de estudio.

Los embriones que presentan mejores parámetros de calidad son transferidos y los restantes de buena calidad se congelan, ambos serán calificados como Embriones de Primera Calidad

Los embriones que no alcanzan los requisitos mínimos de calidad se dejan en cultivo y si dan lugar a un blastocisto de calidad suficiente en D5/D6 son congelados.

### RESULTADOS

De los 135 ciclos incluidos en el estudio 15 no tuvieron transferencia, (cancelación 11%). De los 120 casos con transferencia tuvimos 72 gestaciones, una gestación bioquímica de 60% y clínica de 50%.

### CONCLUSIONES

El porcentaje de embriones de 1ª categoría obtenidos en grupo 1 y grupo 2 es prácticamente el mismo.

Los embriones subóptimos en D3 que se dejan a observación en ambos grupos alcanzaron el estadio de blastocisto con buena calidad en mismas proporciones.

Ante los resultados concluimos que la introducción de PVP en el ovocito no parece afectar sustancialmente a la calidad embrionaria.

Los resultados clínicos son muy similares, sería recomendable aumentar el número de casos con transferencias puras para los grupos de estudio para observar si se marca alguna tendencia.

## P-104: ¿ESTA JUSTIFICADO EL USO DE MACS EN MUESTRAS DE SEMEN CONGELADAS?

D. Agudo, M. San Celestino, D. Becerra, M. Alonso, A. Pacheco, F. Bronet.  
IVI Madrid, Madrid  
[david.agudo@ivi.es](mailto:david.agudo@ivi.es)

### INTRODUCCIÓN

El DNA del espermatozoide es sensible a diferentes factores, como medicamentos, contaminantes, estilo de vida, y a procedimientos a los que podemos someterle, como por ejemplo, la congelación, en tratamientos de reproducción asistida. Esta congelación puede producir daños en su DNA que le hacen perder viabilidad.

### OBJETIVO

En IVI Madrid quisimos comprobar si el tratamiento de muestras de semen congeladas con columnas de anexina, que retienen espermatozoides con DNA fragmentado, sería una buena solución para mejorar los resultados clínicos.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Para ello realizamos un estudio prospectivo, randomizado, ciego, con 99 receptoras de ovocitos que realizaron ICSI con semen congelado, capacitando el semen mediante gradiente de densidad (puresperm) y eluyendo el capacitado en columnas de anexina en las muestras correspondientes al grupo de estudio, 51 casos (B) frente a 48 casos no tratados (A). Para el análisis

estadístico se empleó el paquete estadístico G-stat 2.0.

### RESULTADOS

No se observaron diferencias en cuanto a la tasa de fecundación 76,2% en el grupo A frente a 73,12% en el grupo B, tampoco se encontraron diferencias entre la tasa de gestación clínica (55.26%A vs 54.54%B), tasa de implantación (38.66%A vs 42.45%B) ni tasa de aborto clínico (14.28%A vs 12.5%B) respectivamente.

Tampoco se observan diferencias en cuanto a la media del número de células en los embriones de D2 y D3 de desarrollo en ambos grupos (D2=4.0A vs 3.8B) y (D3=7.0A vs 7.0B) ni en la fragmentación embrionaria en ambos grupos (4.6%A vs 6.1%B) y (5.8% vs 6.4%). Sin embargo cuando analizamos el porcentaje de embriones en función del número de células, observamos un patrón de división más disperso tanto en D2 como en D3 en los embriones del grupo A (50% en 4 células en el grupo A vs 61.2% en 4 células en el grupo B en embriones de D2 de desarrollo)  $p=0.031$  y 27.69% en 8 células en el grupo A vs 36.68% en 8 células en

el grupo B en embriones de D3 de desarrollo, no resultando significativa esta última diferencia.

Finalmente si analizamos el número de embriones con calidad suficiente como para poder transferirlos o congelarlos, encontramos que en el grupo A, el 49.85% de los ovocitos fecundados son transferidos o congelados, mientras que en el grupo B, el 55.91% de los embriones se transfirieron o congelaron, mostrando una tendencia a la significación estadística ( $p=0.110$ ).

### CONCLUSIONES

Con estos resultados, no podemos afirmar que la eliminación de los espermatozoides con daño en su DNA producidos por la congelación previa, mediante el empleo de columnas de anexina, produzca beneficios significativos como para que se instaure de rutina en nuestros procedimientos de descongelación de muestras de semen, aunque si parece mejorar la tasa de embriones utilizables y mejorar el desarrollo embrionario, por lo que más estudios y un mayor número de casos serán necesarios para poder llegar a conclusiones sólidas.

## P-105: TRANSFERIR EN D+4, UNA ALTERNATIVA A TRANSFERENCIAS EN ESTADIOS TEMPRANOS

M. Moragas, G. Millet, R. Aurell, M. Aura y M.J. Torelló  
Unidad Reprod. Asistida. Hospital Quiron Barcelona  
[mmoragas.bcn@quiron.es](mailto:mmoragas.bcn@quiron.es)

### INTRODUCCIÓN

El momento ideal de la transferencia embrionaria (TE) todavía está

en controversia. La mayoría de transferencias en Reproducción Asistida se realizan en estadios tempranos o en estadio de blastocisto.

La transferencia en D+4 de cultivo no es una práctica habitual en los laboratorios y hay pocos trabajos publicados. Recientemente ya



se tienen algunas evidencias bibliográficas que correlacionan el tipo de compactación con la capacidad de implantación del preembrión en D+4 (Tao, 2002; Feil, 2008; Ebner, 2009). Es por ello que la Unidad de Reproducción de Quirón Barcelona ha incorporado el D+4 como posible opción de transferencia.

#### OBJETIVOS

Para reducir costes y evitar trabajo los fines de semana, se posponen a D+4 las transferencias de pacientes con 4 o más ovocitos fecundados que podían coincidir en festivo.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se presentan las tasas de embarazo clínico por transferencia realizadas en función del día de la TE entre D+2 y D+5 de cultivo.

Se realiza el análisis retrospectivo de **275 TE en fresco** de ciclos de FIV propios (ICSI/FIV convencional) realizados entre junio de 2012 y abril 2013.

Criterios para la TE: sistemáticamente se realizan las TE en D+2 y D+3, indistintamente. Las TE en D+5 se realizan en pacientes que desean un único embrión o en casos de ciclos de FIV fallidos donde se quiere seguir el desarrollo de los embriones en cultivo.

Las TE en D+4 se realizan en aquellas pacientes, con 4 o más ovocitos fecundados, cuya transferencia podía coincidir el fin de semana.

Tabla 1.

	Día de Transferencia				TOTAL
	D+2	D+3	D+4	D+5	
Nº EMB/TE	59/133	44/101	17/24	9/17	129/275
%EMB/TE	44.3	43.5	71	52.9	46.9%

Se han utilizado medios de cultivo secuenciales SAGE.

Para la clasificación embrionaria se siguieron los criterios de ASEBIR (2008) excepto para D+4 que se tomó como referencia el score embrionario publicado por Feil et al. (2008) y validado en transferencias de un único embrión.

#### RESULTADOS

El 85.0% de las TE se realizan en estadios tempranos (D+2 y D+3), un 8.7% en D+4 y un 6.1% en D+5. Las tasas de embarazo clínico por transferencia son similares en estadios tempranos (44,3% D+2 y 43.5% D+3) y aparentemente más elevadas en D+4 (71%) y D+5 (52.9%), atendiendo a los criterios del día de la transferencia anteriormente mencionados.

Antes de iniciar este estudio, en nuestro Centro, las TE en D+4 quedaban relegadas a casos de Diagnóstico Genético Preimplantacional (análisis de aneuploidías por FISH), o en criotransferencias donde los embriones descongelados de D+3 se mantenían 24 horas en cultivo para determinar su viabilidad.

La falta de criterios morfológicos predictivos de embarazo es la principal

causa de que no se realicen TE en D+4 de forma sistemática, es por ello que la mayoría de equipos que realizan cultivo largo suelen esperar hasta D+5 para transferir.

La finalidad del estudio es posponer a D+4 algunas transferencias seleccionadas, de estadios tempranos, sin necesidad de prolongarlas hasta D+5. En D+4 el embrión ya ha activado su genoma embrionario, llega al útero en el momento fisiológico y reduce la exposición a condiciones subóptimas de cultivo.

Los resultados obtenidos en D+4 son claramente superiores a los obtenidos en transferencias en estadios tempranos e inferiores a los de D+5 y en ambos casos no son comparables ya que los criterios de selección de las pacientes difieren completamente.

#### CONCLUSIONES

Transferir en D+4 es una opción perfectamente posible y puede ser una alternativa válida a las transferencias en estadios tempranos. Estudios prospectivos con mayor número de casos y un sistema de clasificación universal aceptado ayudará a transferir en D+4 de forma más sistemática

## P-106: ESTUDIO TRIDIMENSIONAL DEL POSICIONAMIENTO CROMOSÓMICO EN CÉLULAS GERMINALES MASCULINAS

Z. Sarrate<sup>1</sup>; M. Solé<sup>1</sup>; J. Blanco<sup>1</sup>; B. Martínez<sup>2</sup>; F. Vidal<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unitat de Biologia Cel·lular. Facultat de Biociències. Universitat Autònoma de Barcelona. Cerdanyola del Vallès (Barcelona). <sup>2</sup>Laboratori de Qualitat de la Imatge. Centre de la Imatge i la Tecnologia Multimèdia. Universitat Politècnica de Catalunya. Terrassa (Barcelona)  
[zaida.sarrate@uab.cat](mailto:zaida.sarrate@uab.cat)

#### INTRODUCCIÓN

Estudios tridimensionales (3D) en núcleos interfásicos muestran una

organización territorial no aleatoria de los cromosomas. La distribución de los territorios cromosómicos (TC) varía dependiendo del tipo celular,

probablemente se relaciona con su funcionalidad y es necesaria para el mantenimiento de la expresión diferencial de las células.

Análisis bidimensionales realizados en estadios iniciales del proceso de la espermatogénesis revelan una proximidad preferente entre los cromosomas sexuales y los cromosomas 15 y 22. Esta distribución cromosómica no aleatoria también se ha observado en núcleos de espermatozoide. Aun así, el conocimiento del comportamiento de los TC durante el transcurso de la espermatogénesis es muy limitado y, en algunos mamíferos, se ha sugerido una redistribución temporal de TC a lo largo del proceso.

### OBJETIVO

Desarrollar un protocolo para el estudio tridimensional del posicionamiento cromosómico en núcleos de las células germinales masculinas.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado muestras congeladas de tejido testicular provenientes de 4 individuos donantes de órganos. Las muestras se han descongelado, pesado y disgregado enzimáticamente. Los recuentos celulares de las suspensiones celulares obtenidas se han valorado mediante cámara de Neubauer. De cada muestra se han recuperado entre  $10^5$  y  $10^6$  células que se han incubado sobre portaobjetos previamente polilisinizados (1mg/mL). La adecuada adhesión celular se ha evaluado mediante microscopía de contraste de fases.

Se ha aplicado un protocolo específico de fijación celular con paraformaldehído (4%) para preservar la morfología tridimensional de las células, seguido de una incubación en 50% formamida durante 24 horas. A continuación las preparaciones se han tratado con pepsina (0,005%) y se han aplicado protocolos de hibridación estándares adaptados a las características de las muestras. Las hibridaciones se han realizado con dos combinaciones de sondas de pintado cromosómico: 1) XCP X-FITC y XCP Y-TexasRed y 2) XCP 1-FITC y XCP Y-TexasRed (Metasystems). Para la contratiñación

de los núcleos se ha utilizado DAPI (0.125µg/mL).

La valoración de las preparaciones se ha realizado con un microscopio confocal Leica TCS SP5 acoplado a un sistema de captura y análisis de imágenes (LAS AF-1.8.1.). Se han obtenido imágenes por planos de cada uno de los fluorocromos por separado mediante filtros específicos. Las imágenes de cada plano se han valorado con el programa de análisis de imágenes ImageJ (versión 1.46).

Ha sido necesario el desarrollo de diferentes *plugins* para realizar las siguientes valoraciones: 1) posición del cromosoma en el núcleo 2) distancia entre cromosomas y 3) proporción que ocupa el cromosoma en relación al volumen nuclear.

### RESULTADOS

La disgregación enzimática ha permitido recuperar una media de  $2,4 \times 10^6 \pm 2,9 \times 10^5$  células a partir de fragmentos testiculares de peso promedio  $0,151 \pm 0,04$  gr.

La utilización de portaobjetos polilisinizados ha permitido una adhesión celular óptima, en cuanto al número y la calidad de las células.

El protocolo de fijación celular utilizado ha permitido la preservación de la morfología nuclear sin afectar a la calidad de las extensiones obtenidas.

La metodología de hibridación y las sondas de DNA seleccionadas han proporcionado preparaciones óptimas para ser analizadas al microscopio confocal. Se han obtenido imágenes 3D de todos los tipos de células espermatogénicas.

Los *plugins* desarrollados para el programa ImageJ permiten analizar la posición y la dimensión de los cromosomas estudiados en relación al volumen nuclear.

### CONCLUSIÓN

La metodología desarrollada permite abordar el análisis tridimensional de

la territorialidad cromosómica en las diferentes células espermatogénicas humanas.

### AGRADECIMIENTOS

Generalitat de Catalunya (proyecto SGR2009-282); Universitat Autònoma de Barcelona (proyecto CF-180034).

## P-107: EVALUACIÓN MORFOCINÉTICA DE LA INFLUENCIA DEL TIPO DE MEDIO DE CULTIVO EN LA PRESENCIA DE MULTINUCLEACIÓN EN EMBRIONES EN DOS CÉLULAS

A. R. Díaz, V. Badajoz, S. Camacho, M.C. Cañadas, J. A. Gragera, L. Martínez, M. Oter, C. Urda.  
GINEFIV S.L., Madrid  
[anardcorujo@gmail.com](mailto:anardcorujo@gmail.com)

### INTRODUCCIÓN

La multinucleación embrionaria es un fenómeno que se ha relacionado con varios factores inherentes a los ciclos de reproducción asistida, como una estimulación ovárica agresiva y obtención de un gran número de ovocitos tras la punción ovárica. Tradicionalmente considerado un parámetro de mal pronóstico: asociado con menor calidad embrionaria y menores tasas de implantación; el uso de incubadores con sistema de monitorización por cinematografía, ha permitido observar una alta frecuencia de embriones que, presentando multinucleación en estado de 2 células, dan origen a embriones con cuatro células mononucleadas, de buena calidad y buen potencial de implantación.

Por otro lado, la presencia de micronúcleos, un tipo de multinucleación frecuente en embriones, ha sido observada en células somáticas y asociada a roturas cromosómicas. Esta inestabilidad cromosómica se ha relacionado con la exposición a distintos agentes externos y se han propuesto mecanismos que explican su aparición. Si bien es cierto que quizás estos descubrimientos no se puedan extrapolar a células germinales, sí sugieren la presencia de mecanismos similares o al menos la necesidad de investigaciones más profundas.

### OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es valorar si el tipo de medio cultivo es un factor

externo que pueda asociarse con la aparición de multinucleación. Para ello, se valoró la presencia de multinucleación en embriones en 2 células, cultivados en dos tipos de medios (secuencial y simple) y se estudió su influencia en las tasas de implantación.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo de ciclos de ovodonación realizados entre mayo del 2011 hasta Abril de 2012. Se realizaron dos grupos: A) 645 ovocitos (57 ciclos) cultivados en un medio simple (Global, LifeGlobal, IVFOnline) y B) 1919 ovocitos (188 ciclos) cultivados en un medio secuencial (Serie G5, Vitrolife). Ambos grupos fueron incubados en EmbryoScope (Unisense, Fertilitech). Para el estudio de la influencia de la multinucleación en la implantación, se seleccionaron los embriones con diagnóstico conocido y se clasificaron en dos grupos: 1) embriones con 100% de implantación y 2) embriones con 0% de implantación. Para la comparación de grupos se realizó un test X2 (SPSS).

### RESULTADOS

El estudio estadístico mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los porcentajes de multinucleación observados en embriones en estadio de dos células, siendo mayores cuando el cultivo se realizó en un medio simple (34,9% medio simple vs 27,6% medio secuencial). Aproximadamente la mitad de la multinucleación se

presentó en una blastómera y la otra mitad en las dos blastómeras (medio simple: 50,3% una blastómera, 49,7% dos blastómeras; medio secuencial: 51,9% una blastómera, 48,1% dos blastómeras). La mayoría de los embriones multinucleados en dos células da lugar a embriones sin multinucleación en cuatro células (87,3% en medio simple y 91,5% en medio secuencial).

El estudio de la incidencia de multinucleación en embriones implantados y no implantados (Tabla 1) muestra que no existen diferencias significativas para ninguno de los grupos estudiados.

### CONCLUSIONES

En nuestro trabajo se demuestra que el tipo de medio utilizado para el cultivo de embriones influye en la presencia de multinucleación en embriones en dos células. Sin embargo, parece que esta multinucleación no influye sobre las tasas de implantación, aunque sería necesario aumentar la casuística para confirmar estos resultados. Ya que gran parte de esta multinucleación es debido a la presencia de micronúcleos, se sugiere evitar su transferencia siempre que sea posible; hasta tener más información sobre los mecanismos que la producen y las posibles consecuencias a largo plazo.

Tabla 1

	Medio secuencial (144)			Medio simple (76)		
	100% Implant (37)	0% Implant (107)		100% Implant (28)	0% Implant (48)	
NO BMN	28 (19,4%)	76 (52,8%)	NS	22 (28,9%)	35 (46,1%)	NS
BMN (1 cel)	7 (4,9%)	25 (17,4%)	NS	6 (9,2%)	14 (18,4%)	NS
BMN (2 cel)	2 (1,4%)	6 (4,2%)	NS	0	6 (6,8%)	NS

## P-108: DINÁMICA DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO EN VARONES JÓVENES

L. Sarabia Cos<sup>1,2</sup>, J. J. Areñe Gonzalo<sup>2</sup>, L. Mínguez Alarcón<sup>2</sup>, A. Cutillas Tolín<sup>2</sup>, J.M. Martínez Díaz<sup>2</sup>, J. Mendiola Olivares<sup>2</sup>, A. M. Torres Cantero<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Biología de la Reproducción. Quirón Dexeus Murcia, Murcia.

<sup>2</sup> División de Medicina Preventiva y Salud Pública. Universidad de Murcia, Murcia.

[laura.sarabia@quiron.es](mailto:laura.sarabia@quiron.es)

### INTRODUCCIÓN

Estudios recientes indican que la fragmentación del ADN espermático es un fenómeno dinámico. El daño en la molécula de ADN de los espermatozoides aumenta con el tiempo tras la eyaculación. Trabajos realizados en humanos y otros mamíferos señalan que la velocidad de fragmentación del ADN espermático es característica de cada especie. No obstante, entre individuos de una misma especie también se observan diferentes patrones de fragmentación. Recientemente, diversos trabajos han explorado o evaluado la dinámica de la fragmentación espermática como herramienta coadyuvante en el estudio de la infertilidad masculina.

### OBJETIVOS

El objetivo de este estudio es identificar patrones de fragmentación temporal del ADN espermático en una población de varones voluntarios jóvenes.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio transversal realizado en jóvenes universitarios

sanos (18-23 años) de la Región de Murcia (n=159) y llevado a cabo entre 2010 y 2011. Los participantes proporcionaron una muestra seminal y cumplieron cuestionarios epidemiológicos sobre hábitos de vida. Se estudió la fragmentación del ADN espermático mediante el método de dispersión de la cromatina espermática (test SCD). Una vez licuada la muestra, se separaron distintas alícuotas que fueron incubadas a 37°C durante distintos periodos de tiempo antes de ser congeladas. Los periodos de tiempo fueron los siguientes: a tiempo 0 horas (T0, valor basal de fragmentación), a 2,5 horas (T1), a 17 horas (T2) y a 24 horas (T3). El índice de fragmentación se definió como el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado (halo pequeño, sin halo y degradados) con respecto al total de los espermatozoides analizados. Se analizaron 300 espermatozoides en cada alícuota. Los patrones de fragmentación se establecieron en función del incremento de fragmentación en los distintos tiempos de observación. El programa informático utilizado fue el Excel 2010 ©.

### RESULTADOS

Alrededor del 85% de los sujetos se ajustaron a 4 modelos principales de dinámica de fragmentación del ADN espermático, a saber: 1) modelo lineal (aumento constante de la fragmentación espermática); 2) modelo logarítmico (aumento mayor de fragmentación en la fase inicial); 3) modelo exponencial (aumento mayor de fragmentación en la fase final) y 4) modelo logístico (aumento mayor de fragmentación en la fase intermedia y menor en la inicial y final).

### CONCLUSIONES

Nuestros resultados coinciden con estudios previos en los que se han descrito distintos patrones en la dinámica de fragmentación del ADN espermático tras la eyaculación. Hasta donde conocemos, este es el estudio con mayor tamaño muestral llevado a cabo para evaluar las distintos patrones de dinámica de fragmentación del ADN espermático en varones. Estos hallazgos abren la puerta a futuros trabajos donde se puedan estudiar los factores y determinantes relacionados con la degradación temporal del material genético espermático en humanos.

## P-109: INFLUENCIA DE LA EDAD DEL VARÓN EN UN PROGRAMA DONACIÓN DE OVOCITOS

C. Alonso, B. Buch; C. Segura; M. Lara; R. Garnica; A. Flores; J.J. Sánchez; A. Pérez; M. Martínez-Moya. ; C. Álvarez

Laboratorio de Reproducción Centro Gutenberg, Málaga.

[calonso@urecentrogutenberg.com](mailto:calonso@urecentrogutenberg.com)

### INTRODUCCIÓN

Aproximadamente un 15% de las parejas son infértiles y más de una

cuarta parte de los casos de infertilidad se atribuyen a factor masculino. Se sabe que la edad materna es uno de los factores pronóstico principales en

fertilidad y también en los tratamientos de Reproducción Asistida. En la literatura, además, se describe que la fertilidad masculina y la calidad

seminal también disminuyen con el aumento de edad del varón. Por otro lado, los cambios socioculturales que hacen retrasar la maternidad en la mujer, influyen igualmente en el varón. En este sentido, no existen datos concluyentes respecto a la influencia de la edad en la reproducción del varón.

#### OBJETIVO

Evaluar el efecto en los resultados clínicos de la edad paterna en un programa de donación de ovocitos.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo de 609 ciclos de donación de ovocitos realizados entre los años 2008 y 2012 en URE Centro Gutenberg Málaga.

Los ciclos se dividieron en dos grupos en función de la edad del varón, menores de 45 años (Grupo 1) y mayores o igual a 45 años (Grupo 2). Se excluyeron los ciclos con donaciones menores de 6 ovocitos MII y ciclos en los que se utilizó semen de donante. La media de ovocitos MII donados fue 11.0 en cada grupo de estudio. En el 100% de los ciclos se utilizó la técnica ICSI.

Como objetivo principal de estudio se evaluó la tasa de gestación y de aborto en ambos grupos.

#### RESULTADOS

Del total de 609 ciclos, 476 (78.16%) correspondieron al Grupo 1 y 133 (21.84%) al Grupo 2. La tasa de fecundación, la calidad de los embriones transferidos y la media de

embriones por transferencia fueron similares en ambos grupos.

La tasa de gestación en el grupo 1 fue del 61.2 % y en el Grupo 2 del 57.2 % ( $p=0.4$ ) y la tasa de aborto de 20.8% y 25.3 % ( $p=0.6$ ) en el Grupo 1 y 2 respectivamente.

#### CONCLUSIONES

Según los datos obtenidos se observa una ligera diferencia favorable en los varones menores de 45 años del programa de donación de ovocitos en relación a las tasas de gestación y aborto, sin embargo las diferencias no alcanzan a ser estadísticamente significativas, por lo que creemos que son necesarios estudios con mayor número de casos para tener conclusiones más consistentes.

## P-110: ANÁLISIS DEL ESPERMATOZOIDE HUMANO MEDIANTE TÉCNICAS DE MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA

M.J. Gómez-Torres<sup>1</sup>, A. Romero<sup>1</sup>, I. Vilella<sup>1</sup>, P. Mira, M.C. Fuentes<sup>1</sup>, I. Moragues<sup>1,2</sup>, M.L. Medrano<sup>1,2</sup>, J. Aizpurua<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de Alicante. <sup>2</sup>IVF Spain, Alicante, España.

[mjose.gomez@ua.es](mailto:mjose.gomez@ua.es)

La morfología espermática refleja la salud reproductiva y el estrés a nivel testicular. La evaluación morfológica es clave en el estudio de la fertilidad masculina. No obstante, la no existencia de métodos estandarizados y en ocasiones subjetivos, son fuente de controversias y ausencia de un consenso en la clasificación de los tipos celulares *a priori* definidos. La especie humana se caracteriza además por presentar una gran variedad de formas espermáticas y que influyen en establecer patrones estandarizados. Aunque diferentes alteraciones de base genética, como la globozoospermia o el síndrome de las colas cortas son fácilmente reconocibles, algunas formas anormales son de difícil adscripción. De este modo, la relación entre forma-tamaño espermática y cómo influye en la clasificación celular requiere de nuevos análisis morfométricos. El objetivo de nuestro

estudio fue el análisis por Morfometría Geométrica (MG) de los patrones cefálicos normales (N), anormales (A), redondos (R) y piriformes (P), en cinco sujetos normozoospermicos clasificados según los criterios de la OMS (2010). A todas las muestras se les realizó un seminograma previo y se procesaron para su posterior análisis mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). La forma y tamaño de las células se analizó en micrografías  $\sim 10.000X$ . Para cada célula se seleccionaron puntos anatómicos (*landmarks*) que definieron la región cefálica, acrosoma y región postacrosomal. Cada punto se registró como coordenada y se procesaron mediante un Análisis Procrustes Generalizado. La variación morfométrica entre células se calculó con técnicas de análisis multivariante. El análisis de Componentes Principales (PC<sub>1-2</sub> 67,8%) mostró diferencias en la configuración morfométrica entre

células. Los tipos A, P y R presentan una mayor variabilidad en forma que los N. Cuando se considerada la relación entre forma (PC<sub>1</sub> 40,6%) y tamaño celular, únicamente se documenta un cambio en los tipos A ( $r = 0,5$ ;  $P < 0,001$ ). Un Análisis Canónico (CV<sub>1-2</sub> 86,5%) mostró que el  $\sim 90\%$  de células se clasifican como normales (validación cruzada). El 60% de anormales, no obstante presentaron una conformación normal y para el resto de tipos celulares (P y R) se encontraron menores % de clasificación correcta. Nuestra aproximación morfométrica concuerda con estudios previos donde se ha demostrado que existe una correlación clínica entre los tamaños extremos de las células y su capacidad fecundante. Sin embargo, demuestra la necesidad de cuantificar parámetros de forma para realizar una clasificación más precisa. Los espermatozoides A se presentan como formas *borderline*



entre los P y R. Otros factores de estrés (fisiológico, mental y medioambiental) pudieran ser la causa de la génesis de estas formas. La aplicación de la MG

precisa pequeñas variaciones en forma y permitirá comparar las habilidades funcionales del espermatozoide desde una nueva perspectiva morfológica.

Este trabajo ha sido subvencionado por la Cátedra *Human Fertility* de la Universidad de Alicante (<http://web.ua.es/es/catedrahumanfertility/>).

## P-111: MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS (MIV) VS CICLOS DE FIV/ICSI EN PACIENTES CON SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO (SOP)

P. Torres; I. Peinado; A. Marzal; M. De la Orden; J.M. Rubio  
Servicio Ginecología (Reproducción Humana). Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Valencia  
[patriblanc81@hotmail.com](mailto:patriblanc81@hotmail.com)

### INTRODUCCIÓN

El manejo clínico del reclutamiento folicular en pacientes con SOP es complicado y la respuesta a la estimulación es generalmente excesiva. Para evitar los efectos secundarios del Síndrome de Hiperestimulación Ovárica (SHEO), así como la cancelación sucesiva de los ciclos de FIV, existe como alternativa la técnica de MIV de ovocitos en ciclos sin estimulación ovárica.

### OBJETIVO

Comparar resultados de ciclos de MIV vs FIV/ICSI en pacientes con SOP y predisposición a sufrir SHEO.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo de 180 pacientes con SOP según criterios de Rotterdam: 162 casos fueron estimulados para FIV/ICSI y a 18 casos se les realizó MIV de ovocitos. Se incluyeron pacientes  $\leq 38$  años y con recuento de  $> 20$

foliculos antrales. Los ciclos de MIV se realizaron sin estimulación ovárica y se indicó la inducción con hCGr cuando la línea endometrial alcanzó los 7-8 mm, independientemente del tamaño folicular. La punción aspiración ecoguiada se realizó con aguja fina (19 Grays) en el grupo de MIV y mediante protocolo habitual en el grupo de FIV/ICSI. Los ovocitos del grupo MIV se cultivaron en medio comercial específico suplementado con FSH/LH y se realizó ICSI a los metafase II (MII) obtenidos en día 0 y día 1. La transferencia embrionaria de todas las pacientes tuvo lugar en día 2/día 3 con independencia del grupo según los criterios establecidos en nuestra unidad.

### RESULTADOS

Se encuentran diferencias significativas entre los grupos FIV/ICSI vs IVF con respecto a los días de estímulo ( $10.19 \pm 2.76$  vs  $8.41 \pm 2.06$ ;  $\alpha=0.011$ ), diámetro del folículo mayor ( $18.55 \pm 7.48$  vs  $7.92 \pm 6.24$ ;  $\alpha=0.000$ ), dosis total

de FSH administrada ( $1463.88 \pm 617.18$  vs  $517.65 \pm 243$ ;  $\alpha=0.000$ ), número de MII en DO ( $6.37 \pm 3.87$  vs  $0.78 \pm 1.17$ ;  $\alpha=0.000$ ) y número de embriones transferidos ( $1.85 \pm 0.45$  vs  $2.15 \pm 0.56$ ;  $\alpha=0.028$ ). Sin embargo, se observa similar ( $\alpha > 0.05$ ) tasa de fecundación (71.69% vs 70.05%), calidad embrionaria ( $1.33 \pm 0.78$  vs  $1.38 \pm 0.87$ ), transferencia embrionaria (80.5% vs 76.5%) y tasa de gestación (45.3% vs 38.5%). Se observa elevada tasa de cancelación por RHO en el grupo de FIV/ICSI, siendo nula en los casos de MIV (12% vs 0%;  $\alpha=0.225$ ).

### CONCLUSIÓN

La MIV es una técnica accesible que ofrece óptimos resultados y permite reducir costes de estimulación, facilitar el tratamiento y anular el riesgo de padecer SHO en casos de mujeres con SOP. No obstante, sería conveniente aumentar el número de casos de MIV en este tipo de pacientes para confirmar los resultados obtenidos.

## P-112: LA DESVITRIFICACIÓN EMBRIONARIA EL DÍA PREVIO A LA TRANSFERENCIA, MEJORA LOS RESULTADOS DEL CICLO

C. Álvarez; M. Sánchez; C. García; M. Resta; G. González  
Hospital General Universitario de Albacete, Albacete  
[ristina10lleo@gmail.com](mailto:ristina10lleo@gmail.com)

### INTRODUCCIÓN

La criopreservación embrionaria es una técnica necesaria en los laboratorios

de embriología clínica que permite rentabilizar al máximo los ciclos de FIV. Los embriones se pueden vitrificar por diversos **motivos**, por la producción de

un número superior de embriones de calidad a los que se puedan transferir, como estrategia terapéutica en casos de alteración de la receptividad

endometrial, por riesgo de Síndrome de Hiperestimulación Ovárica, así como por cualquier otra causa por la que se deba cancelar la transferencia.

La desvitrificación embrionaria se puede realizar el mismo día de la transferencia, con unas horas de diferencia para que sea posible comprobar el estado del embrión o incluso uno o varios días previos a la misma con la intención de ver la evolución de los embriones.

#### OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es demostrar en un ciclo de transferencia de embriones congelados, que día es el más apropiado para su desvitrificación, el día previo o el día de la transferencia.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio retrospectivo en el que se analizaron de 259 ciclos de desvitrificación de embriones realizados en el Hospital General Universitario de Albacete (años 2010-2012). En 178 ciclos se transfirió al menos un embrión, en los 81 restantes no hubo transferencia por degeneración o no evolución embrionaria.

Los ciclos con transferencia se dividieron en dos grupos:

- Grupo I (n=79): La desvitrificación se realizó el mismo día de la transferencia embrionaria.
- Grupo II (n=99): La desvitrificación se realizó el día previo a la transferencia embrionaria.

Los embriones se vitrificaron (Vit Kit®-Freeze, Irvine Scientific) en "cryotip", la vitrificación se realizó en días +2, +3 y +5. Se comparó la edad de las pacientes, tasa de embriones congelados y calidad de los mismos, supervivencia embrionaria y calidad en el momento de la desvitrificación y de la transferencia, el número de embriones transferidos, tasa de betas positivas, de embarazo clínico, de implantación y de abortos. La significación de las diferencias se estimó utilizando el test de t-Student y el análisis de  $\chi^2$  ( $p < 0,05$ )

#### RESULTADOS

Se estudiaron 259 ciclos de desvitrificación correspondientes a 194 pacientes (edad media  $34,10 \pm 4,09$ ). El número medio de ovocitos recuperados por ciclo fue:  $11,89 \pm 4,74$ , el número medio de ovocitos MII:  $10,02 \pm 4,35$ , la tasa de fecundación: 74,78%, siendo el 17,19 % embriones de calidad AB y el 82,81% de calidad CD. Se transfirió un 31,70% de los embriones, se congeló el 45,74 % y el 22,56 no fueron evolutivos.

Se hicieron dos grupos según el día de la desvitrificación embrionaria. En el grupo I (n=79) la edad media fue  $33,95 \pm 3,87$  y en el grupo II de  $34,25 \pm 4,37$ . Se encontraron diferencias significativas entre el grupo I y el II en el número de embriones transferidos de calidad AB ( $0,1 \pm 0,36$  vs  $0,35 \pm 0,59$ ;  $p=0,001$ ) y de calidad CD ( $1,63 \pm 0,66$  vs  $1,42 \pm 0,78$ ;  $p=0,049$ ) respectivamente, siendo similar el número total de embriones transferidos en cada grupo ( $1,75 \pm 0,54$  vs  $1,78 \pm 0,51$ ;  $p=0,695$ ). También se encontraron diferencias en la tasa de  $\beta$ -hCG positiva ( $21,52\%$  vs  $36,41\%$ ;  $p=0,023$ ), embarazo clínico ( $17,71\%$  vs  $34,30$ ;  $p=0,010$ ) e implantación ( $11,81\%$  vs  $23,23\%$ ;  $p=0,017$ ) siendo mayores en el grupo de ciclos en el que la desvitrificación fue el día previo a la transferencia.

#### CONCLUSIONES

- Los embriones que se transfieren al día siguiente de la desvitrificación son de mejor calidad.
- Las tasas de embarazo clínico e implantación son mejores en los ciclos donde los embriones se desvitrificaron el día previo a la transferencia.
- La desvitrificación el día previo a la transferencia nos permite seleccionar mejor los embriones que se van a transferir mejorando los resultados del ciclo.

## P-113: MEJORA DE LAS TASAS DE EMBARAZO CON EL USO DE LAS COLUMNAS DE ANEXINA PARA SELECCIONAR ESPERMATOZOIDES NO FRAGMENTADOS FRENTE A LA BIOPSIA TESTICULAR.

M. Dorado; M. González; L. Aguilera; M. Hebles; A. Fernández; B. Migueles; M. Gallardo; N. Cruz; P. Sánchez; F. Sánchez  
Ginemed Clínicas, Sevilla  
[mdorado@ginemed.es](mailto:mdorado@ginemed.es)

#### INTRODUCCIÓN

La integridad del genoma paterno es de vital importancia en el inicio y mantenimiento de un embarazo a término. La fragmentación del ADN espermático es una causa potencial de infertilidad. El daño de ADN en los espermatozoides puede ser inducido por distintos mecanismos.

Uno de los procesos que juega un papel importante es el que provoca la fragmentación de ADN a nivel posttesticular durante el transporte de los espermatozoides a través del epidídimo. Esto viene avalado por estudios previos que demuestran que la fragmentación de ADN es más alta en espermatozoides del epidídimo y eyaculados que en espermatozoides testiculares.

Este daño potencial de ADN que los espermatozoides pueden experimentar a su paso por el epidídimo podría evitarse recurriendo a la microinyección de espermatozoides obtenidos directamente del testículo.

Estudios recientes han demostrado que el uso de las columnas de anexina V como método de selección de espermatozoides

no apoptóticos es una herramienta eficaz y no invasiva que mejora las tasas de embarazo en pacientes sometidos a TRA (técnica de reproducción asistida) por alta fragmentación y podría sustituir a la biopsia testicular.

#### OBJETIVO

El objetivo de nuestro estudio es valorar la eficacia de ambas técnicas para seleccionar espermatozoides no dañados para utilizarlos en TRA. Para ello comparamos la tasa de embarazo en pacientes sometidos a ciclos de Reproducción Asistida en los que la causa de esterilidad era factor masculino por alta fragmentación y se sometieron a biopsia testicular en fresco frente a selección de espermatozoides por columnas de anexina (MACS) en eyaculado.

#### MATERIAL Y MÉTODO

Entraron en el estudio las parejas que iban a ser sometidas a ICSI, tanto con

óvulos propios como donados, y el varón presentaba una fragmentación espermática por encima de 30%. Éstos pacientes no habían conseguido reducirla con antioxidantes orales. Se separaron en dos grupos. El primero estaba formado por pacientes a los que realizamos biopsia testicular el día de la punción folicular y el segundo lo formaban aquellos a los que aplicamos MACS para seleccionar los espermatozoides.

#### RESULTADOS

En el grupo en el que utilizamos las MACS (n=58) previo a la microinyección espermática conseguimos una tasa de embarazo evolutivo superior con respecto al grupo al que realizamos biopsia testicular (n=47). En el grupo de biopsia conseguimos una tasa de embarazo del 46,8% frente al 65,5% que obtuvimos en el grupo de las MACS obteniéndose diferencias significativas con una p=0.042.

#### CONCLUSIONES

El daño de ADN en los espermatozoides juega un papel importante para la consecución del embarazo. Aunque este daño potencial de ADN podría evitarse recurriendo a la microinyección de espermatozoides obtenidos directamente del testículo, en nuestro estudio hemos observado mejores resultados utilizando la separación por MACS. Éste resultado puede ser debido a que los espermatozoides de testículo, a pesar de evitar la fragmentación posttesticular, son más inmaduros. El uso de las MACS es más ventajoso pues es una técnica no invasiva para el varón y menos costosa para los pacientes. Por tanto, utilizando la muestra de espermatozoides seleccionados por filtrado magnético hemos conseguido mejorar la tasa de embarazo evolutivo que obteníamos con biopsia de testículo en pacientes con alta fragmentación.

## P-114: HORMONA ANTIMÜLLERIANA COMO MARCADOR DE RESERVA OVÁRICA EN UN PROGRAMA DE FIV/ICSI

B. González Soto<sup>1</sup>, A. Muñoz<sup>1</sup>, M.L. Rivera<sup>2</sup>, E. Tejedor<sup>3</sup>, A. Mazariegos<sup>1</sup>, M. García-Yuste<sup>1</sup>, Y. Pascual<sup>1</sup>, AB. Rodríguez<sup>1</sup>, E. Mancha<sup>1</sup>, F. Vázquez<sup>1</sup>.  
<sup>1</sup>Unidad de Reproducción. Servicio de Ginecología y Obstetricia. Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid. <sup>2</sup>Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario de Salamanca. <sup>3</sup>Bioquímica Clínica. Servicios Centrales. Hospital Universitario Vall d'Hebron. Barcelona  
[beukasoto@gmail.com](mailto:beukasoto@gmail.com)

#### INTRODUCCIÓN

La Hormona Antimülleriana (AMH) es una glicoproteína dimérica relacionada con el crecimiento y diferenciación celular, es producida por las células de la granulosa de los folículos pre-antrales y antrales pequeños. En la mujer, la AMH es un marcador endocrino de su reserva ovárica, reflejando no sólo la cantidad de folículos ováricos, sino también, la calidad ovocitaria.

#### OBJETIVOS

El objetivo de este estudio fue analizar la fiabilidad de la AMH como marcador de reserva ovárica, y como factor de exclusión en un programa de FIV/ICSI de

un Sistema de Sanidad Público. Además, comparar los valores de dicha hormona, con el resto del estudio hormonal de esterilidad (FSH, LH, Estradiol) y Recuento de folículos antrales.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Durante 2012 se determinaron 136 AMH en pacientes de la Unidad de Reproducción del HURH de Valladolid. Los criterios para solicitar esta hormona fueron: FSH basal en día 3 > 10 mUI/ml, Estradiol basal en día 3 >50 pg/ml, y recuento de folículos antrales < 5. Consideramos AMH <1ng/ml como patológicas. Se analizaron también otras hormonas: FSH, LH y Estradiol.

#### RESULTADOS

El 48,5% (66) de las mujeres tuvieron una AMH < 1ng/ml. El 78,8% (52) de estas pacientes tenían ≥35 años y sólo el 21,2% (14) fueron menores de 35 años.

Se estudió el comportamiento del resto de hormonas en estas pacientes con AMH patológicas: El estradiol se encontraba por encima de 50 en más del 50,1 % de estas pacientes. La FSH estaba por encima de 10 en el 57%. La LH se encontraba por encima de 6 en el 49.8% de las mujeres.

En estas pacientes hubo 3 gestaciones espontáneas, con LH/FSH menores del corte <6 y <10, respectivamente, pero

con valores de estradiol superiores a la media.

#### CONCLUSIONES

La reserva ovárica de la mujer debe ser analizada mediante un conjunto

de pruebas: análisis de FSH, LH, Estradiol, AMH y recuento de folículos antrales, y debe ser individualizada en función de cada paciente. La determinación de la AMH no debería negar la inclusión en un programa de FIV/ICSI, pero debe informarse a la

pareja de las bajas probabilidades de éxito.

## P-115: EFECTO DEL CULTIVO EMBRIONARIO A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE OXIGENO SOBRE LA CALIDAD EMBRIONARIA Y RESULTADOS CLÍNICOS

J. Ten<sup>1</sup>; F. Juanals<sup>1</sup>; J. Guerrero<sup>1</sup>; I. Ochando<sup>1</sup>; A. Rodríguez-Arnedo<sup>1</sup>; J. de Juan<sup>1,2</sup>; R. Bernabeu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Fertilidad Bernabeu, Alicante, <sup>2</sup>Catredra de Medicina Reproductiva, Dpto. Biotecnología, Universidad de Alicante, Alicante  
[jten@institutobernabeu.com](mailto:jten@institutobernabeu.com)

#### INTRODUCCIÓN

Son numerosos los trabajos presentes en la literatura que han estudiado el efecto perjudicial de las especies reactivas de oxígeno (ROS) sobre la calidad embrionaria durante el cultivo *in vitro* y sobre las tasas de éxito tras técnicas de reproducción asistida (TRA). La mejora de las condiciones de cultivo contribuiría sin duda a optimizar el rendimiento de las mismas. En esta línea se ha extendido en los laboratorios el uso de incubadoras de cultivo a bajas presiones parciales de O<sub>2</sub>, bajo la hipótesis de que mimetizando las condiciones que se encuentran en el tracto reproductor femenino se podrían reducir los niveles de radicales libres. En cualquier caso sus beneficios no están demostrados y los resultados publicados son contradictorios.

#### OBJETIVO

Estudiar el efecto sobre la calidad embrionaria y resultados clínicos tras TRA de dos sistemas de cultivo embrionario a distintas concentraciones de oxígeno (6% y 20%).

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio prospectivo realizado en el periodo comprendido entre Noviembre 2012 y Marzo 2013 en el que se

incluyeron 215 parejas que llevaron a cabo un tratamiento de FIV/ICSI. De éstas, 56 pacientes realizaron tratamientos con ovocito propio y 159 fueron receptoras de ovocitos. En todos los casos la transferencia se realizó en estadio de blastocisto. Se compararon dos sistemas de cultivo: 1) cultivo embrionario convencional al 20% O<sub>2</sub>, empleando el CCM™ (Vitrolife) como medio de cultivo a partir de día 3; 2) cultivo embrionario a 6% O<sub>2</sub>, con Blastocyst Medium (Cook Medical) como medio para soportar la fase de desarrollo a blastocisto. Las incubadoras utilizadas para el cultivo a 6% O<sub>2</sub> son Planer BT37 (Middlesex, UK) y para el cultivo al 20% O<sub>2</sub> Labotect C200 (Göttingen, Germany). Los principales parámetros evaluados fueron la calidad embrionaria en día 5 de desarrollo, la tasa de embarazo clínico y la tasa de implantación. Los datos se analizaron empleando el test t-student para variables continuas y el chi-cuadrado para variables categóricas mediante el paquete estadístico SPSS.

#### RESULTADOS

En el grupo de embriones procedentes de ovocito propio se observó una mejora, aunque no significativa, de la tasa de embarazo clínico (38.2% vs 63.6%; p=0.063) y de la tasa de implantación (25% vs 37.2%; p=0.17) en el grupo de embriones desarrollados

a baja concentración de oxígeno. Los parámetros de calidad embrionaria analizados también se vieron afectados positivamente por el cultivo a 6% O<sub>2</sub>, pero sin ningún resultado significativo.

En el grupo de embriones que provienen de receptoras de ovocitos no se observó diferencias entre los resultados obtenidos en los distintos sistemas de cultivo.

#### CONCLUSIONES

La mejora de la calidad embrionaria y tasa de éxito en los embriones procedentes de ciclos con ovocito propio refuerza la hipótesis de que una concentración de oxígeno similar a la fisiológica es más adecuada para el cultivo de embriones.

En contra de lo esperado, en los tratamientos de receptoras de ovocitos, no se observan diferencias entre los distintos sistemas de cultivo de embriones. La diferencia de 10 años entre la edad media de las donantes (25.4±3.9) y de las pacientes con ovocito propio (35.2±3.6) nos lleva a especular que los embriones procedentes de mujeres jóvenes y de fertilidad probada no se benefician de un cultivo a bajas presiones de oxígeno debido presumiblemente a su elevada calidad ovocitaria. Un incremento en el número de casos es necesario para confirmar esta hipótesis.

## P-116: ¿EXISTEN DIFERENCIAS MORFOLÓGICAS EN LOS EMBRIONES PROCEDENTES DE OVOCITOS FRESCOS VS VITRIFICADOS?

M. Roldán; L. Muela; B. Gadea; M. Martínez; I. Pérez-Cano; M. Muñoz.  
IVI Alicante, Alicante  
[mariaroldan82@hotmail.com](mailto:mariaroldan82@hotmail.com)

### INTRODUCCIÓN

La vitrificación, tanto por su eficiencia como por los resultados clínicos que aporta, es la mejor técnica disponible en la actualidad para la criopreservación ovocitaria. Representa la mejor alternativa para la preservación de la fertilidad femenina, la creación de bancos de ovocitos y para resolver determinadas situaciones clínicas que se dan en los tratamientos de reproducción asistida.

Los blastocistos procedentes de ovocitos vitrificados presentan una calidad similar a la de blastocistos generados a partir de ovocitos frescos, demostrando así que conservan intacta su capacidad de desarrollo in vitro hasta día 5 o 6.

### OBJETIVOS

Determinar si existen diferencias entre las técnicas de ICSI con ovocitos frescos y ovocitos vitrificados en el rendimiento de los ciclos, resultados clínicos, así como en la calidad de las cohortes de embriones generados en cada grupo.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron retrospectivamente 635 embriones procedentes de 108 ciclos del programa de ovodonación realizados entre 2011 y 2012. Los grupos de estudio fueron: ICSI con ovocitos frescos (N= 381) vs ICSI con ovocitos vitrificados-desvitrificados (N= 254).

Se calcularon los resultados clínicos: tasa de fecundación, gestación clínica, tasa de implantación, gestación evolutiva y tasa de congelación. Así como la tasa de embriones de buena calidad y el porcentaje de transferencias en D+3 y D+5.

En D+2 y D+3 se evaluaron: número medio de células, porcentaje y tipo de fragmentación, compactación y bloqueo.

En D+5 y D+6: porcentaje de blastocistos tempranos (BT), cavitados (BC), expandidos (BE), iniciando hatching (BHi) y hatching completo (BH). Y la tasa de blastocistos con masa celular interna y trofoectodermo de calidad buena e intermedia.

Los datos se analizaron con tablas de resultados de comparación múltiple por test de Chi-cuadrado con ajuste del p valor de HOLM. También se utilizó el Test de Wilcoxon.

### RESULTADOS

En los resultados clínicos no se observaron diferencias en la tasa de fecundación, gestación clínica, implantación y gestación evolutiva. Tampoco en la tasa de congelación ni en el porcentaje de embriones de buena calidad. (Tabla 1)

De las características morfológicas analizadas, el tipo de fragmentación D+2 fue significativamente diferente, presentando mayor porcentaje de fragmentación esparcida entre las

blastómeras el grupo procedente de vitrificados. Esta diferencia desaparece en D+3 donde se igualan dichos porcentajes.

En la compactación D+3, se obtienen diferencias significativas entre ambos grupos presentando los vitrificados mayor porcentaje de mórulas y menor porcentaje de embriones con inicio de compactación.

### CONCLUSIONES

El cultivo a blastocisto a partir de ovocitos vitrificados presenta una eficiencia en cuanto a morfología y resultados clínicos comparables a la obtenida por ovocitos frescos, habiéndose encontrado algunas diferencias significativas a nivel morfológico lo que animaría a realizar nuevos estudios en esta línea.

	Ovocitos frescos (n=64)	Ovocitos vitrificados (n=44)	p
Gestación clínica (%)	54,7	56,8	NS
Implantación (%)	39,7	40,9	NS
Gestación evolutiva (%)	48,4	52,3	NS
Tasa congelación (%)	16,9	18,4	NS
Embriones buena calidad (%)	36,4	35,8	NS

Tabla 1. Resultados clínicos. NS, diferencias significativas  $p < 0.05$



## P-117: TRATAMIENTOS DE FERTILIDAD Y CALIDAD DE VIDA

L. Molina, P. Velarde, A.M. Molina, M.J. Aragón  
 Centro y Ciudad: Grupo Médico de Reproducción, GMER. Cádiz.  
[admin@gmer.es](mailto:admin@gmer.es)

### INTRODUCCIÓN

Según la OMS Calidad de Vida es : “ la percepción que un individuo tiene de su lugar en la existencia, en el contexto de la cultura y del sistema de valores en los que vive y en relación con sus objetivos, sus expectativas, sus normas, sus inquietudes. Se trata de un concepto muy amplio que está influido de modo complejo por la salud física del sujeto, su estado psicológico, su nivel de independencia, sus relaciones sociales, así como su relación con los elementos esenciales del entorno”.

La infertilidad se ha relacionado con disminución de la calidad de vida, concretamente a nivel de: salud mental, vitalidad, comportamiento emocional, funcionamiento psicológico y las relaciones ambientales y sociales.

### OBJETIVOS

Vamos a realizar un estudio piloto sobre Calidad de Vida en Tratamientos de Reproducción Asistida Humana. Con este estudio se pretende evaluar la Calidad de Vida de los pacientes durante el tratamiento.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio piloto observacional descriptivo transversal.

La población de estudio está constituida por pacientes que acuden a la clínica, y que sean sometidos a alguno de los tratamientos de reproducción asistida.

La información la vamos a obtener pasando a los pacientes un cuestionario dos veces, la primera antes de comenzar el tratamiento, y la segunda el día de finalización de la técnica, antes de saber si hay o no embarazo.

Considerando el pequeño tamaño de la muestra el método estadístico

aplicado ha sido mediante intervalos de confianza para datos apareados con un 0,5% de coeficiente de confianza.

La muestra para este estudio ha sido de 18 pacientes.

### RESULTADOS

Antes de someterse al tratamiento de reproducción asistida el total de hombres y mujeres participantes en el estudio consideran que su calidad de vida es buena.

En cuanto a los niveles de ansiedad y depresión un 18,18% de las mujeres presentan problemas previos al tratamiento, frente a un 28,57% de los hombres.

Una vez sometidos al tratamiento de Reproducción Asistida vemos como un 36,36% de las mujeres ven afectada su calidad de vida, frente al 28,57% de los hombres.

Durante el tratamiento el 27,27% de las mujeres y el 57,14% de los hombres muestran que sus sentimientos frente al tratamiento de infertilidad se han visto afectados negativamente.

Tras el tratamiento un 50% de las mujeres reflejan que su relación de pareja se ha visto afectada negativamente por el tratamiento, este porcentaje es menor en los hombres (14,28%). Al mismo tiempo un 63,63% de las mujeres ven afectados sus sentimientos ante el problema de fertilidad, comienzan a aparecer sentimientos negativos. Este cambio en los sentimientos afecta a los hombres en un 28,57% de los casos.

En cuanto al entorno que rodea a las parejas el cambio es más acusado en los hombres, ya que un 42,85% de estos ven afectado negativamente su entorno ante los problemas de fertilidad, frente al 36,36% de las mujeres.

La tolerabilidad frente al problema y tratamiento de la infertilidad también se ve más afectada en el caso de los hombres, ya que un 42,85% de los varones ven afectada su tolerabilidad ante el tratamiento, frente al 36,36% de las mujeres.

En cuanto a la ansiedad y la depresión, tenemos que tras el tratamiento de la de fertilidad el 27,27% de las mujeres ven aumentados estos problemas frente al 57,14% de los hombres.

### CONCLUSIONES

Ante estos datos podemos concluir que la calidad de vida de los pacientes sometidos a tratamiento de fertilidad se ve alterada negativamente durante el mismo; simultáneamente, los niveles de ansiedad y depresión también se ven aumentados.

Sería conveniente ampliar el tamaño de la muestra para obtener datos más fiables, ya que podría ser interesante evaluar cómo esta alteración en la calidad de vida de los pacientes puede afectar al éxito o fracaso de la técnica.

Sería interesante evaluar si este cambio en la calidad de vida está más o menos influenciado por el modo de administración de la medicación o por sus efectos secundarios.

## P-118: EMBRYOLOGICAL, CLINICAL AND ULTRASTRUCTURAL STUDY OF HUMAN OOCYTES PRESENTING INDENTED ZONA PELLUCIDA

M. Sousa<sup>1</sup>, J. Teixeira da Silva<sup>2</sup>, J. Silva<sup>2</sup>, M. Cunha<sup>2</sup>, P. Viana<sup>2</sup>, E. Oliveira<sup>1</sup>, R. Sá<sup>1</sup>, C. Soares<sup>1</sup>, C. Oliveira<sup>2</sup> and A. Barros<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Microscopy, Laboratory of Cell Biology, UMIB, Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar (ICBAS), University of Porto, Porto, Portugal; <sup>2</sup>Centre for Reproductive Genetics Alberto Barros, Porto, Portugal; <sup>3</sup>Department of Genetics, Faculty of Medicine, University of Porto, Alameda Prof. Hernâni Monteiro, Porto, Portugal.

[msousa@icbas.up.pt](mailto:msousa@icbas.up.pt)

### INTRODUCTION

The human zona pellucida (ZP) is an extracellular glycoprotein matrix which surrounds the oocyte. It serves several functions, such as to mediate sperm binding (ZP3), induce the acrosomal reaction (ZP2, ZP4), prevent polyspermy and protect the embryo until implantation. These glycoproteins are interlinked by ZP1. Human oocyte dysmorphisms attain a large proportion of retrieved oocytes from ART treatment cycles. There are several intracytoplasmic morphological abnormalities, a few with improved impact on implantation (1). Extracytoplasmic defects involve an abnormal morphology of the ZP, perivitelline space and polar body. Regarding reports on ZP abnormalities, thin, absent and oval ZP were associated with low birth term rates.

### OBJECTIVES

The aim of the present study was to describe a novel dysmorphism of the ZP (**indented zona pellucida**).

### MATERIALS AND METHODS

There were 6 cases and 13 cycles. Women underwent controlled ovarian hyperstimulation (2) using a GnRH short antagonist protocol. In 4 cycles a long agonist protocol was used. For stimulation, rFSH was used. For final oocyte maturation HCG was administered, with two exceptions, **in the 4th cycle of case 5** (agonist buserelina) and in case 6 (rHCG). Microinjection was performed as described (3). Oocytes were cultured in sequential media. For luteal support progesterone was used. **In the 4th cycle of case 5**, this was associated with 2 mg estradiol hemihydrate (12/12h) for the

same time of progesterone and HCG (1500 IU) at days 3 and 6 after oocyte pick-up. For transmission electron microscopy, oocytes were processed according with published protocols (4). Controls were all ICSI cycles during 2005-2011. For statistics we used the Chi-Square-Test (Fisher Exact Test) and the Independent Samples T-test for equality of means, 2-sided.

### RESULTS

We evaluated all ART treatment cycles during seven consecutive years and found 13 treatment cycles (6 patients) with all oocytes presenting an indented ZP. In addition, these oocytes showed total or partial absence of the perivitelline space, absence of resistance to ZP and oolema penetration during microinjection, and low ooplasm viscosity during aspiration. In 3 cases that had more than 1 treatment cycle this dysmorphism was recurrent and attained all oocytes. When compared to controls, data showed significant low oocyte maturity (42% vs 81.6%) and high cycle cancellation (30.8% vs 8.5%) rates, normal degeneration (3.4% vs 6.3%) and fertilization rates (69% vs 69.5%), and low pregnancy (15.4% vs 33.3%) and live-birth delivery (7.7% vs 27.7%) rates per cycle. **The only term pregnancy was achieved in cycle 4 of patient 5.** Ultrastructure analysis revealed a ZP structure with large empty electrolucent regions, an outer ZP layer with an indented surface with protuberances and a thick inner ZP that obliterated the perivitelline space. There was evidence of exocytosis of ZP material by the oocyte.

### DISCUSSION

The ultrastructural data suggest a deficient synthesis of ZP1. In conclusion,

oocytes with indented ZP appeared to be associated with low oocyte maturity, high cycle cancellation rates and low

live-birth delivery rates. Due to the absence of evidence related to female age and stimulation protocols, and the fact that in 5 of the 6 patients there was an ovarian pathology, the presence of this dysmorphism in all oocytes and recurrence in all cycles of 3 patients clearly suggests a folliculogenesis disturbance due to an ovarian factor. Data also suggests that the use of an agonist instead of HCG with special luteal support might favour a higher cytoplasmic and nuclear maturity in these specific cases.

### REFERENCES

- (1) Sá et al (2011) *FertilSteril* 96(1)143-149;
- (2) Pinto et al (2009) *ReprodBiolEndocrinol.* 7(5)1-10;
- (3) Tesarik et Sousa (1995) *FertilSteril* 64(4)770-776;
- (4) Sousa et Tesarik (1994) *HumReprod* 9(12)2374-2380.

## P-119: COMPARACIÓN DE 2 MEDIOS DE TRANSFERENCIA Y CULTIVO LARGO

L.M.R. Menes; F. Graña ; P. Duque; M. Pigni; V. Sánchez; J. Quintana; E. García; P.E. de la Fuente; C. García-Ochoa  
 CEFIVA, Oviedo  
[luz@cefiva.com](mailto:luz@cefiva.com)

### INTRODUCCIÓN

La elección del medio de cultivo es una variable más a tener en cuenta para ayudar a mejorar los resultados del laboratorio de FIV. La industria farmacéutica dispone de medios comerciales sometidos a controles de calidad, que tienen en cuenta los cambios fisiológicos que sufre el embrión en cada etapa.

### OBJETIVOS

Se trata de comparar los resultados obtenidos con dos medios de cultivo de la misma casa comercial (Vitrolife), para la transferencia embrionaria y cultivo a partir de día +3. El medio CCM debe equilibrarse a 37° y 5% CO2 contiene aminoácidos, albúmina sérica humana al 2%, insulina y penicilina G. El medio G-2 equilibrado a 37°C y 6% CO2 contiene gentamicina, aminoácidos y vitaminas medio que se suplementa con albúmina al 5%.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se han incluido 444 transferencias embrionarias separando 2 grupos: Grupo 1 se utiliza CCM y GRUPO 2 G-2.

Las pacientes fueron seleccionadas de manera aleatoria y sistemática comprobando que ambos grupos son homogéneos en cuanto a la edad, técnica, indicación e incluso día de la transferencia +2 ó +3.

Se realiza la transferencia en el medio seleccionado, los embriones de buena calidad son vitrificados ese mismo día (A y B) y los embriones de peor calidad (C y D) se dejan en cultivo a blastocistos, en el medio asignado. La clasificación embrionaria se hizo en base base a los criterios de ASEBIR.

### RESULTADOS

MEDIOS	Ciclos	Gestaciones	Abortos	Tasa de gestación	Tasa de abortos
CCM	257	85	18	33,07%	21,18%
G2	187	70	8	37,43%	11,43%
<b>Total</b>	<b>444</b>	<b>155</b>	<b>26</b>	<b>34,91%</b>	<b>16,77%</b>

N.S.

N.S.

#### CCM

DESTINO	Número de embriones	Porcentaje
Desechados	362	90,73%
Vitrificados	37	9,27%
<b>Total</b>	<b>399</b>	

#### G2

DESTINO	Número de embriones	Porcentaje
Desechados	263	93,26%
Vitrificados	19	6,74%
<b>Total</b>	<b>282</b>	

N.S:

El análisis estadístico utilizado fue la prueba exacta de Fisher.

### CONCLUSIONES

A pesar de las diferencias en cuanto a las tasas de gestación y de aborto, dichas diferencias no resultan estadísticamente significativas. Respecto al destino de los embriones, los resultados son similares en cuanto al porcentaje de embriones desechados y los que desarrollaron hasta el estadio de blastocisto.

## P-120: REDUCIR A UNO LOS DIAS DE ABSTINENCIA EN UN CICLO DE FIV/ICSI NO AFECTA A LA TASA DE EMBARAZO EVOLUTIVO

I. Pons, R. Cercas, C. Villas, C. Braña, S. Fernández-Shaw  
URH García Del Real, Madrid.  
[ipons@urh.es](mailto:ipons@urh.es)

### INTRODUCCIÓN

La OMS (Organización Mundial de la Salud) recomienda que las muestras de semen para Fecundación In Vitro (FIV) se obtengan con una abstinencia de 2 a 7 días. Algunos estudios apuntan que, en varones con la fragmentación de ADN en espermatozoides alterada, la disminución de los días de abstinencia podría reducir el índice de espermatozoides fragmentados y con ello la tasa de aborto, mejorando así la tasa de embarazo evolutivo.

### OBJETIVOS

El objetivo de este estudio es encontrar una posible mejoría en la tasa de embarazo evolutivo en tratamientos de FIV/ICSI al reducir los días de abstinencia de la muestra utilizada a uno.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio prospectivo randomizado realizado entre 2009 y 2012 a todos los primeros ciclos de FIV/ICSI que

utilizaron ovocitos y semen propios. En el grupo 1 (N=148) la muestra de semen utilizada en el ciclo de FIV/ICSI se obtuvo con un día de abstinencia. En el grupo 2 (N=148) la muestra utilizada tenía de 3 a 7 días de abstinencia.

No se impusieron límites respecto a la concentración ni movilidad espermática. Las muestras se obtuvieron mayoritariamente en la clínica y se prepararon en menos de media hora con gradientes de densidad. Se realizó FIV convencional, ICSI o mixta según protocolo de la clínica.

### RESULTADOS

La media de horas de abstinencia fue de 27.2 y 101.4 para cada grupo. Ambos grupos tuvieron características demográficas similares: edad del varón (37 vs 36.9 años), edad de la mujer (36.1 vs 35.8), duración de la esterilidad, diagnóstico, fragmentación de ADN en semen (14.4% vs 12.7%), FSH basal, estradiol basal y recuento de folículos antrales ( $P>0.05$ ). El tipo de protocolo de estimulación, número

de ovocitos maduros obtenidos (7.3 vs 7.6), tipo de inseminación (FIV 14% vs 15.5%; ICSI 25% vs 19.5%; combinada 60.8% vs 64.8%), tasa de fecundación (70.2% vs 70%), número de embriones evolutivos (2.4 vs 2.5) y número de embriones transferidos (1.4 vs 1.4) fueron parecidos en ambos grupos ( $P>0.05$ ).

La tasa de embarazo (41.8% vs 43.9%), tasa de aborto (6.7% vs 6.7%) y tasa de embarazo evolutivo (35.1% vs 37.1%) fueron comparables en ambos grupos ( $p>0.05$ ).

### CONCLUSIONES

Los resultados con muestras de semen tras un día de abstinencia son similares a los obtenidos tras 3 a 7 días de abstinencia. Aunque es posible que la disminución de los días de abstinencia mejore el pronóstico de la FIV/ICSI cuando se utilizan muestras de semen con fragmentación elevada, este protocolo no mejora los resultados cuando se aplica en todas las muestras de semen.

## P-121: ¿CUAL ES EL EFECTO REAL DE LA SEPARACIÓN MAGNÉTICA DE ESPERMATOZOIDEOS (MACS)?

A. Domingo; N. Presilla; I. Calvo; E. Martínez; J.A. Agirregoikoa; G. Barrenetxea; J.L. de Pablo; C. Anarte.  
Quirón Bilbao (Bizkaia).  
[adomingo.bil@quiron.es](mailto:adomingo.bil@quiron.es)

### INTRODUCCIÓN

La Apoptosis o la muerte celular programada es el proceso ordenado de muerte de una célula ante estímulos extra o intercelulares. Estudios recientes asocian la apoptosis espermática con la infertilidad

masculina. La traslocación de la fosfatidilserina en la membrana de los espermatozoides apoptóticos tempranos es una propiedad que sirve para poder detectar y seleccionar dichos espermatozoides mediante la separación Magnética de espermatozoides (MACS). De esta

manera, logramos enriquecer la muestra con espermatozoides no-apoptóticos.

### OBJETIVOS

1. Estudiar si las columnas de Anexina realmente disminuyen el porcentaje

de apoptosis en las muestras de semen.

- Determinar el efecto de las Columnas de Anexina en la calidad seminal.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo observacional. Hemos analizado las muestras de semen en 25 pacientes todos ellos pacientes de la Clínica de Reproducción Asistida de Quirón Bilbao. El estudio se realizó durante el primer trimestre del 2013.

Los parámetros seminales (concentración, movilidad y morfología) fueron evaluados según los criterios de la OMS 2010.

La capacitación espermática se realizó mediante gradientes de densidad.

Se estudio el porcentaje de apoptosis en las muestras en fresco, tras capacitar y tras el filtrado mediante MACS (se analizo la fracción negativa).

La determinación de apoptosis en las muestras en fresco y capacitado se realizó mediante Anexina V-FITC/IP y citometría de flujo.

#### RESULTADOS

La media del porcentaje de espermatozoides apoptóticos en las

muestras en fresco es de  $31,88 \pm 22,46$ , en las muestras capacitadas es de  $29,23 \pm 12,67$  y tras filtrar las muestras mediante las Columnas de Anexina es de  $13,4 \pm 7,53$ .

Los parámetros de calidad seminal muestran un diferente comportamiento, la concentración desciende drásticamente al pasar de un  $30,45 \pm 31,09$  de media en fresco a un  $10,42 \pm 8,55$  tras capacitar las muestras y finalmente a un  $1,42 \pm 1,39$  tras ser filtradas. En cuanto a la movilidad se nota un ligero ascenso en el porcentaje de espermatozoides progresivos (de un  $47,93 \pm 3,87\%$  en fresco,  $64,16 \pm 17,67\%$  tras capacitar y a un  $52,64 \pm 27,33\%$  después de MACS% tras el tratamiento) y desciende levemente el porcentaje de espermatozoides no progresivos ( $45,73 \pm 25,4\%$ ,  $27,91 \pm 17,32$  a un  $39,57 \pm 27,81\%$ ).

#### CONCLUSIONES

El porcentaje de apoptosis en las muestras en fresco es mayor porque en el plasma seminal se encuentran sustancias anticapacitantes y por esta razón tras capacitar las muestras el porcentaje de apoptosis disminuye. Cuando la muestra se filtra mediante MACS disminuye el porcentaje de apoptosis, pero no consigue eliminarlo

completamente. Estos resultados sugieren que tenemos que seguir seleccionando los espermatozoides según su movilidad y morfología para conseguir una correcta fecundación y embriones de buena calidad.

Los parámetros de calidad seminal muestran un diferente comportamiento. La concentración disminuye porque los espermatozoides se quedan retenidos en el filtro. Asimismo el porcentaje de espermatozoides progresivos aumenta tras el filtrado.

Con estos resultados que podemos confirmar es que las columnas de Anexina V nos ayudan a reducir el porcentaje de apoptosis y de esta manera nos ayudan a seleccionar el "mejor espermatozoide" para el tratamiento de ICSI.

Este estudio sigue en activo, para poder aumentar la "n" y poder valorar también el efecto de los MACS en otros parámetros como la tasa de gestación, tasa de fecundación y calidad embrionaria.

## P-122: IMSI EN UN TERCER INTENTO DE FIV-ICSI

M. Morales; L. Andrés; M. Sánchez; E. Ricciarelli; E. Hernández; J. Cuadros  
Centro de Medicina de la Reproducción y Ginecología FivMadrid, Madrid  
[jcuadros@fivmadrid.es](mailto:jcuadros@fivmadrid.es)

#### INTRODUCCIÓN

La IMSI se ha propuesto como una alternativa a la ICSI en los casos en los que existe un factor masculino severo, con una teratozoospermia grave, donde se podría realizar una selección mejor de los espermatozoides a alta magnificación. Sin embargo, algunos estudios donde se han comparado estas dos técnicas sin una selección

previa de los pacientes, no encuentran diferencias entre ICSI e IMSI.

#### OBJETIVOS

En este estudio pretendemos discernir si la IMSI seleccionando espermatozoides a 6500X puede ser útil en los casos donde ha habido dos ciclos previos sin embarazo, bajo la propuesta de que de esta manera podríamos resolver casos

con un factor masculino que no es posible detectar a un aumento de 400X.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

En un estudio retrospectivo realizado entre enero de 2009 y octubre de 2012 se compararon los resultados de embarazo clínico, implantación y abortos, entre ciclos en un tercer intento en los que se realizó ICSI vs ciclos en los que se



realizó IMSI. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante Chi-cuadrado.

### RESULTADOS

Las tasas de embarazo clínico de ICSI vs IMSI fueron de 37,9% (69/182) y 63,6% (7/11), respectivamente; las tasas de implantación fueron 15% (90/600) y 23,5% (8/34), respectivamente y los abortos fueron 18,8% (13/69) y 14,3%

(1/7), respectivamente. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas, sin embargo la comparación de las tasas de embarazo clínico dio una  $p=0,08$ .

### CONCLUSIONES

Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, los resultados muestran una tendencia a

obtener mejores resultados utilizando la IMSI en un tercer intento. Por lo tanto, la IMSI podría ser recomendable en los casos con una teratozoospermia severa, con un número de espermatozoides que permita una mejor selección a una alta magnificación.

## P-123: DINÁMICA DE FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO EN CABALLO UROSPÉRMICO

L.Y. Parra-Forero, C. López-Fernández, J.A. Montiel, G. Mendoza, M. Morones, V. Zenteno, L.A. Cruz, J.A. Guevara-G, A. Góngora, A. García-Contreras  
Laboratorio de Imagenología. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México  
[lyparraf19@gmail.com](mailto:lyparraf19@gmail.com)

### INTRODUCCIÓN

El hallazgo incidental de orina en los eyaculados de caballos ha sido descrito ampliamente por la literatura, en criaderos donde la monta es de forma natural no es detectable hasta que el caballo es sometido a un examen andrológico constante, sus causas varían desde procesos inflamatorios, infecciosos, virales, problemas en la inervación de la parte lumbosacra y malas conformaciones de la región genito-urinaria.

### MATERIALES, MÉTODOS Y RESULTADOS

El paciente es un caballo de 4 años de edad de raza Azteca, su función zootécnica es de exhibición y fue elegido para un experimento sobre parámetros reproductivos de caballos en la Ciudad de México, para ser incluido en este experimento se le realizó un examen clínico donde no se evidenció normalidad alguna, no hubo historia de incontinencia urinaria, dolor de espalda o afección nerviosa, en los exámenes de laboratorios evidenció leve leucocitosis. Se realizaron 9 colectas de eyaculados en 9 semanas, de estos en 4 ocasiones se evidenció contaminación con orina. Se evaluó volumen, concentración espermática y no se encontraron diferencias significativas, sin embargo

se vio disminución de espermatozoides (Spz) de morfología normal ( $63.3\% \pm 15.6$ ) y en la motilidad de los mismos ( $43.2\% \pm 6.8$ ) ( $P < 0.0001$ ). El índice de fragmentación (IFG) se realizó con el Test de Dispersión de Cromatina (SCD), estos fueron medidos en semen fresco conservado a 37 grados, una muestra fue tomada de forma consecutiva en los siguientes tiempos, (IFG 0) inmediatamente después de la colecta, (IFG 1) a los 15 minutos, (IFG 2) 30 minutos, (IFG 3) 1 hora, (IFG 4) 2 horas, (IFG 5) 3 horas y (IFG 6) 5 horas. Los porcentajes de IFG de los eyaculados contaminados con orina mostraron diferencias significativas con los que no fueron contaminados ( $P < 0.0001$ ). Las medias de los porcentajes de los IFG de los eyaculados contaminados y no son los siguientes de manera consecutiva: (IFG 0) 17.75 y 10.8, (IFG 1) 38.25 y 18.8, (IFG 2) 60.75 y 38.4, (IFG 3) 86 y 55.6, (IFG 4) 95.75 y 74, (IFG 5) 100 y 92.2, (IFG 6) 100 y 98.4.

### DISCUSIÓN

La causa principal de esta enfermedad no es encontrada en la mayoría de los casos, su hallazgo es incidental como en este caso, en la historia del paciente no se reporta problemas de micción y su libido no mostro ninguna alteración entre los eyaculados con y

sin contaminación, sin embargo en la evaluación espermática se observaron cambios significativos en cuanto a morfología y motilidad probablemente por el daño ocasionado por los cristales, los cambios osmóticos y de pH ocasionados por la presencia de orina en el eyaculado, la literatura reporta que un aumento de 10 mg/dl en la creatinina en el plasma seminal ya generan cambios en la morfología y motilidad de los Spz. Las consecuencias de que se llegara a dar servicio a la yegua con este eyaculado son amplias, endometritis post servicio, endometritis *per se*, falla en la concepción, pérdidas embrionarias y malformaciones genéticas, dependiendo del daño ocasionado en el ADN espermático. En cuanto a los cambios observados en el IFG es evidentemente elevado en eyaculados contaminados con orina, la alteración ocasionada por la orina puede ocasionar cambios en mecanismos enzimáticos que podrían estar involucrados en la activación e inactivación de promotores que aumenten la susceptibilidad de naturalización y desnaturalización del ADN espermático, dejándolo expuesto a las alteraciones epigenéticas importantes como la acetilación y metilación de histonas y ADN, la agregación de estos grupos químicos

hacen que la transcripción no se dé por la inactivación de la ARN polimerasa, en cuanto a la desacetilación de las histonas devuelve la carga positiva al ADN comprimiéndolo al nucleosoma impidiendo que los factores de transcripción entren. La estructura del ADN alterada queda susceptible a romperse por pérdida de protaminas, de esta manera en la técnica SCD la formación de halos de un tamaño que sobrepase el diámetro de la cabeza

del Spz nos indica que el ADN está fragmentado, para diferenciar si la ruptura es de doble cadena sería necesario la implementación de la técnica de TUNEL.

#### CONCLUSIONES

Es necesario que los animales que van a ser reproductores sean evaluados en un periodo de tiempo adecuado y determinado por el veterinario

para descartar esta enfermedad y de esta manera retirarlo del programa reproductivo o ser tratado inmediatamente, al igual la medición de creatinina en el eyaculado o plasma seminal es recomendable ya que hay reportes de pacientes con conformaciones anómalas de uréteres que en el momento de la eyaculación adiciona pequeñas cantidades de orina que son imperceptibles en un examen macroscópico.

## P-124: ANTIOXIDANTES Y MEJORA DE LOS PARÁMETROS SEMINALES

V. Masedo; T. Rubio; C. Carrascosa; J. Escobar; C. López; E. López  
Unidad de Reproducción Hospital La Vega, Murcia.  
[ura@hospitallavega.es](mailto:ura@hospitallavega.es)

#### INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes como el omega 3, DHA, Zinc, selenio, vitamina C y E... ayudan a eliminar especies reactivas de oxígeno (ROS) que son una de las causas del estrés y daño celular en el espermatozoide. Los antioxidantes se presentan como un complemento que ayuda a mejorar la calidad seminal del varón.

#### OBJETIVOS

Evaluar si la ingesta de complementos alimenticios con antioxidantes tipo combinados (DHA, vitaminas, coenzima Q10...) o tipo único (DHA de microalgas), mejora los parámetros seminales en varones subfértiles aumentando con ello las probabilidades de éxito en los tratamientos de reproducción asistida.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Ensayo clínico aleatorio realizado en nuestra Unidad de Reproducción del Hospital La Vega, Murcia. Se estudian 43 casos de varones subfértiles que presentan alguna alteración seminal como asteno y/o oligozoospermia y que han tomado como mínimo 30 días

de antioxidantes tipo único (Gesta-DHA) o tipo combinado (Andromás).

Se realiza un seminograma inicial con capacitación espermática para conocer la calidad seminal del paciente y se vuelven a analizar los mismos parámetros seminales de estudio tras el tratamiento con antioxidantes el día de la técnica realizada (IAC o FIV/ICSI).

Se analiza concentración espermática (M/ml), movilidad espermática (% A+B) y recuperación de espermatozoides móviles (REM), según últimos criterios de la OMS 10".

Estudio estadístico realizado mediante *t-Student*.

#### RESULTADOS

Tras el análisis de los parámetros estudiados se ha observado que los pacientes han mejorado tras la ingesta de antioxidantes en la movilidad progresiva pasando del 18,9% al 25,6% de A+B y sobretodo en el REM, aumentando de 3,5 M a 6 M después del tratamiento. Hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en ambos parámetros ( $p < 0,05$ ).

En cuanto a la concentración de espermatozoides se observa una pequeña disminución sin diferencias estadísticas (35,8M/ml vs 28,7 M/ml).

#### CONCLUSIÓN

Esta mejora en cuanto a movilidad progresiva y recuento de espermatozoides móviles tras el tratamiento con antioxidantes en estos pacientes, nos anima a continuar con el estudio y aconsejar la toma de estos preparados con el objetivo de mejorar la calidad seminal y obtener una mejor muestra de esperma el día de la técnica de reproducción, incrementando con ello las probabilidades de éxito.

La disminución de la concentración espermática podría tener relación con el menor número de días de abstinencia que se les pide tener a los varones el día de la técnica en comparación con el día del análisis diagnóstico inicial.

Por otro parte el tratamiento con este tipo de complementos ofrece psicológicamente al varón un aumento en su autoestima y una forma más positiva de afrontar los tratamientos de reproducción asistida.

## P-125: COMPARACIÓN DE RESULTADOS ENTRE FIV CONVENCIONAL Y MICROINYECCIÓN EN LOS CICLOS DE INSEMINACIÓN MIXTA FIV/ICSI

C. Bou, L.Herrero, C. Losada, M. Cruz, D.Agudo, F. Bronet  
IVI Madrid, Madrid  
[cbou@ivi.es](mailto:cbou@ivi.es)

### INTRODUCCIÓN

En nuestro laboratorio realizamos la inseminación mixta FIV/ICSI en primeros ciclos cuando la calidad seminal es óptima y se obtienen más de 5 ovocitos en la punción. Se destinan a cada técnica la mitad de los ovocitos, elegidos al azar.

### OBJETIVOS

Comparar ambas técnicas cuando hacemos transferencias puras de embriones procedentes de FIV ó de ICSI. Además, el resultado del ciclo determinará la técnica a utilizar en el ciclo siguiente en caso de no conseguir gestación.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyen en este estudio retrospectivo 700 ciclos de FIV/ICSI en el 2011 y 2012. Se realizan un total de 636 transferencias (90,8 %); en 167 (26,2%) se transfieren sólo embriones de FIV, en 138 (21,6%) sólo embriones de ICSI. Además todos los casos presentan embriones evolutivos

de ambas técnicas, siendo la calidad embrionaria el criterio de selección para la transferencia. La edad media de cada grupo es  $35\pm 3,3$  y  $36\pm 3,7$  años respectivamente.

La calidad seminal en fresco debe cumplir como mínimo: concentración superior a 15 millones de espermatozoides/ml, más del 35% con movilidad progresiva y más de 1% con buena morfología.

El análisis estadístico incluye un Chi-cuadrado siendo el nivel de significación estadística si  $p < 0,05$ .

### RESULTADOS

Se obtienen diferencias estadísticamente significativas cuando hacemos transferencias puras de FIV versus ICSI en la tasa de gestación bioquímica (61,7% vs 49,3%;  $p=0,0299$ ), tasa de gestación clínica (55,1% vs 41,3%;  $p=0,0164$ ), tasa de gestación evolutiva (48,5% vs 34,8%;  $p=0,0159$ ), tasa de fecundación con FIV convencional (72,6% vs 56,9%;  $p=0,0041$ ), tasa

de fecundación con microinyección (71,9% vs 81,7;  $p=0,0450$ ). Y no obtenemos diferencias estadísticas entre el FIV versus ICSI en la tasa de implantación (40,6% vs 30,8%;  $p=0,0762$ ), tasa de aborto (12,0% vs 15,8%;  $p=0,3370$ ), tasa de embriones evolutivos (52,0% vs 48,2%;  $p=0,5088$ ), y tasa de congelación (28,2% vs 25,8%;  $p=0,6389$ ).

### CONCLUSIONES

Cuando la calidad embrionaria es similar en ambas técnicas debemos dar prioridad a transferir los embriones de FIV por los mejores resultados obtenidos, en todos los parámetros analizados en este estudio, en favor de esta técnica.

Según estos datos se confirma que la inseminación mixta FIV/ICSI es un test de la capacidad fecundante del semen, disminuye el riesgo de cancelación por fallo de fecundación empleando sólo una de esas técnicas (5% en FIV y 1,8% en ICSI), y se puede utilizar como guía para posibles futuros ciclos.

## P-126: TRANSFERENCIAS DE BLASTOCISTOS VITRIFICADOS EN UN PROGRAMA DE PGD: RESULTADOS CLÍNICOS

B. Sánchez; M.D. Lozano; M. J. Tomás; J. C. García Lozano; A. Peciña; R. Fernández; J. L. Moliní; S. Borrego; G. Antiñolo.  
UGC Genética, Reproducción y Medicina Fetal. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla.  
[beatriz.sanchez.sspa@juntadeandalucia.es](mailto:beatriz.sanchez.sspa@juntadeandalucia.es)

### INTRODUCCIÓN

Las transferencias embrionarias en un programa de Diagnóstico

Genético Preimplantatorio (PGD) se realizan habitualmente en estadio de blastocisto (d+5). Cuando no es posible hacer la transferencia en

fresco por riesgo de hiperestimulación ovárica (SHO) o hay preembriones supernumerarios, en nuestro centro utilizamos la vitrificación en

sistema cerrado como método de criopreservación.

#### OBJETIVOS

Presentar los resultados clínicos obtenidos en nuestro programa de PGD para enfermedades monogénicas tras la transferencia de blastocistos previamente biopsiados y vitrificados en sistema cerrado.

#### MATERIAL Y MÉTODO

Analizamos de forma retrospectiva, desde Octubre de 2005 a Abril de 2013, las transferencias de blastocistos vitrificados dentro de nuestro programa de PGD para enfermedades monogénicas. De los 285 ciclos de PGD realizados, en 59 ciclos (20,7% de los ciclos), correspondientes a 45 pacientes, se han vitrificado un total de 137 embriones. La indicación de la vitrificación ha sido bien por riesgo de SHO o por existencia de preembriones supernumerarios. La vitrificación se ha realizado en día 5 de desarrollo embrionario.

Se han iniciado 35 ciclos de transferencia en 26 pacientes, en los que se han desvitrificado 59 blastocistos.

La transferencia se ha realizado siempre el mismo día de la desvitrificación.

Se han empleado medios comerciales para la vitrificación y la desvitrificación (Irvine Scientific's Vitrification Freeze Kit and Thaw Kit), y un sistema cerrado (Cryotips TM) como soporte.

#### RESULTADOS

De los 59 blastocistos desvitrificados han sobrevivido 53 (89,8%), realizándose 34 transferencias a 25 pacientes (media de 1,6 embriones transferidos). En 6 pacientes la criopreservación se ha realizado por riesgo de SHO (no tuvieron transferencia en fresco). De estas 6 pacientes, 4 han quedado gestantes, siendo 3 gestaciones únicas a término y otra que ha terminado en aborto de primer trimestre. Los 29 ciclos restantes se han realizado en 20 pacientes con embriones supernumerarios, obteniéndose 5 gestaciones. De ellas 2 gestaciones dobles a término, 1 única a término y dos gestaciones evolutivas en su cuarto y quinto mes de gestación respectivamente. Las gestaciones corresponden a ciclos de PGD para

Fibrosis Quística (2), Corea de Huntington (1), Hemofilia A (2), Distrofia Muscular de Duchene (2), Distrofia Miotónica Tipo I (1) y Síndrome de X Frágil (1).

En total hemos obtenido 9 gestaciones clínicas (26,5% por ciclo transferido; 36% por paciente transferida), con una tasa de implantación del 20,7%. No se han encontrado discordancias entre el diagnóstico genético preimplantatorio y el diagnóstico postnatal de los niños nacidos.

#### CONCLUSIONES

En un programa de PGD para enfermedades monogénicas la congelación de preembriones se ha convertido en una necesidad. Los resultados obtenidos muestran que la vitrificación en sistema cerrado es un método eficaz y eficiente para criopreservar blastocistos previamente biopsiados, permitiendo posponer la transferencia en ciclos con riesgo de SHO sin mermar sus posibilidades de gestación así como aumentar las tasas de gestación acumulada.

## P-127: VITRIFICACIÓN EMBRIONARIA EN DÍA 2 VS DÍA 3 EN UN PROGRAMA DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL

C. Albert; A. Galán; A. Delgado; A. Cobo, S. Pérez; M.J. de los Santos; M.J. Escribá  
IVI Valencia, Valencia  
[carmela.albert@ivi.es](mailto:carmela.albert@ivi.es)

#### INTRODUCCIÓN

A fin de maximizar el éxito reproductivo en un programa de diagnóstico genético preimplantacional (DGP), una posible opción es la crioconservación embrionaria previamente a la biopsia, pudiendo realizarse en día 2 (VITD2) o día 3 (VITD3) de desarrollo, lo que conlleva ventajas y desventajas logísticas. Aquí pretendemos evaluar la repercusión embrionaria y clínica de esta práctica.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo que incluye 71 procedimientos; 38 vitrificaron embriones en D2 (VITD2=284) y 33 en D3 (VITD3=192).

Concerniente a las variables clínicas, se registró la edad de la paciente, características de la estimulación, niveles séricos de E2 y P4. Referente a las variables propias de gametos y embriones, se registró: número de ovocitos recuperados, MII, fecundados

y embriones vitrificados. Tras la desvitrificación, se computó: número de embriones >50% de las blastómeras intactas, embriones biopsiados, blastocistos, embriones normales y, embriones transferidos y/o vitrificados. Referente a los resultados reproductivos se registró: tasa de cancelación, gestación e implantación.

Los datos de los dos grupos (VITD2 y VITD3) se analizaron con el paquete estadístico SPSS17.0, utilizando tests de chi-cuadrado para las variables

discretas y ANOVA para las variables continuas así como para la descripción de los datos.

## RESULTADOS

Concerniente a las variables propias de las pacientes, ovocitos recuperados (16.3±10.7; 13.5-19.1), MII (13.7±8.2; 11.7-15.9), fecundados (9.8±5.8; 8.3-11.3) y media de embriones vitrificados por paciente (7.4±3.7; 5.8-8.9), no encontramos diferencias significativas.

Los resultados obtenidos en ambos grupos de estudio (VITD2 vs VITD3) y referentes al resultado del DGP in vitro e in vivo, se muestran en la siguiente tabla:

## CONCLUSIONES

La estrategia de vitrificar embriones en D2 ó D3 no altera el resultado global del DGP ni in vivo ni in vitro. Pese al mayor número de embriones biopsiados por cigoto y, el mayor potencial de desarrollo a blastocisto observado en el grupo VITD2, el número de efectivos finalmente obtenidos en D5 se iguala en ambos grupos, rindiendo además, idénticos resultados reproductivos.

Vitrificar embriones en D3 para su posterior desvitrificación y biopsia, penaliza la capacidad de desarrollo

	VITD2	VITD3	p-valor
Nº ovocitos fecundados	318	314	
Nº embriones vitrificados (%)	284 (91.3)	192 (73.2)	<0.01
Embriones vitrificados por paciente (media±DS)	8.3±5.2	7.4±3.7	(p=0.447)
Nº embriones >50% blastómeras intactas (%)	281 (98.9)	180 (93.7)	=0.003
células en D3 (media±DS; IC)	7.1±1.9 (6.9-7.3)	7.6±2.1 (7.3-7.9)	=0.005
Nº embriones biopsiables por cigoto	220 (69.2)	179 (56.7)	<0.05
Nº embriones cromosómicamente normales (%)	54 (24.5)	46 (25.7)	=0.88
Nº embriones evolutivos D5/ biopsiado	185 (84.5)	133 (74.3)	=0.02
Nº embriones normales y evolutivos D5 /biopsiado	54 (24.5)	45 (25.1)	=0.44
Nº pacientes	38	33	
Embriones normales y evolutivos D5/ paciente (media±DS)	2.2±1.4	1.9±1.8	>0.05
Transferencias (tasa cancelación)	24 (36.8)	24 (27.3)	=0.5
Nº embriones transferidos (media±DS)	39 (1.0±0.9)	39 (1.2±0.9)	=0.478
Nº gestaciones (tasa gestación)	12 (50)	14 (58.3)	=0.77
Nº sacos (tasa implantación)	12 (30.8)	14 (35.9)	=0.78

a blastocisto; pudiendo deberse a la biopsia de embriones con menor tasa de

supervivencia celular, que comprometería su viabilidad ulterior in vitro.

## P-128: INFLUENCIA DE LA HORA DE LA PUNCIÓN FOLICULAR EN EL NÚMERO DE OVOCITOS OBTENIDOS

L. Iraurgui; I. Sainz; I. Mezo; V. Fernández; Z. Larreategui; M. Ferrando; A. Pellicer  
 IVI Bilbao – Leioa Bizkaia  
[fivbilbao@ivi.es](mailto:fivbilbao@ivi.es)

### INTRODUCCIÓN

Como ya es sabido, en la fase folicular del ciclo menstrual el estradiol suprime la producción de hormona luteinizante (LH). Una vez que el óvulo alcanza la madurez, el estradiol alcanza su nivel máximo, revirtiéndose este efecto y estimulando la liberación de gran cantidad de LH.

Este pico de LH a mitad de ciclo induce tres fenómenos: la reanudación de la meiosis, de manera que a las 32 horas los ovocitos están en metafase II; producción de enzimas que degradan la pared folicular para permitir la salida del ovocito a las 36 horas; y el aumento del citocromo p-450, provocando la especialización de las células de la granulosa, que pasan a producir

progesterona con el fin de preparar el endometrio para una posible implantación.

Debido a su semejanza con la LH, la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) se usa clínicamente para inducir la ovulación, ésta induce la liberación de los ovocitos aproximadamente a las 36 horas de su



administración, por lo que es en ese momento cuando se debe realizar la punción folicular.

#### OBJETIVO

En el presente estudio se ha querido comprobar si el retraso o adelanto en la hora de la punción folicular programada, afecta al número de ovocitos obtenidos respecto a los esperados.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un análisis retrospectivo donde se incluyeron 295 pacientes de las cuales se analizó la hora de administración de hCG, la hora en la que se realizó la punción ovárica, los ovocitos esperados según la foliculometría (considerando los mayores de 14mm dos días antes de la recuperación ovocitaria) y los obtenidos finalmente en la punción folicular.

Se evaluó el porcentaje de pacientes en las cuales se recuperaron menos ovocitos de los esperados tanto en las punciones realizadas a las 36 horas de la administración de hCG como a las realizadas antes o después de la hora programada ( $\pm 1$  hora).

#### RESULTADOS

De 295 pacientes, la punción folicular de 168 se realizó tarde (entre 15 y 45 minutos) de las cuales 49, el 29,16% obtuvo menos ovocitos de los previstos por foliculometría.

Las punciones foliculares de 22 pacientes se realizaron antes de la hora programada (10 y 30 minutos) de las cuales 7 el 31,8% recuperaron menos ovocitos de los previstos por foliculometría.

Finalmente 105 pacientes se realizaron a la hora programada (36 horas post hCG)

de las cuales 33 el 31,43% obtuvieron menos ovocitos de los previstos por foliculometría.

#### CONCLUSIÓN

El porcentaje de pacientes que recuperaron menos ovocitos de los esperados según la foliculometría es el mismo en las punciones realizadas antes, a la hora y después de la hora de punción folicular programada (36 horas post administración de la hCG).

Según nuestro estudio, tanto un adelanto como un retraso de  $\pm 45$  minutos en la hora de la punción folicular parece no tener una influencia negativa en el número de ovocitos recuperados. No obstante, los resultados obtenidos son preliminares creyendo ser necesario aumentar el número de casos incluidos en el estudio.

## P-129: DETERMINANTES DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO EN VARONES JOVENES DEL SURESTE ESPAÑOL

L. Sarabia Cos<sup>1,2</sup>; J.J. Areñe Gonzalo<sup>2</sup>; L. Mínguez Alarcón<sup>2</sup>; A. Cutillas Tolín<sup>2</sup>; J. Mendiola Olivares<sup>2</sup>; A.M. Torres Cantero<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Biología de la Reproducción. Quirón Dexeus Murcia, Murcia. <sup>2</sup>División de Medicina Preventiva y Salud Pública. Universidad de Murcia, Murcia.

[laura.sarabia@quiron.es](mailto:laura.sarabia@quiron.es)

#### INTRODUCCIÓN

Se estima que un 15% de las parejas en edad reproductiva presentan problemas de fertilidad, siendo en muchas ocasiones desconocido el origen de las causas de dicha infertilidad. La integridad del ADN espermático se ha propuesto como una de las posibles causas de la denominada infertilidad de origen desconocido. Las causas que dan lugar a las roturas en la molécula de ADN son variadas y en ocasiones están relacionadas con exposiciones a tóxicos ambientales y/u ocupacionales o a los hábitos alimentarios. Varios estudios han analizado la relación entre los hábitos de vida, como el consumo de alcohol, tabaco, etc. y los niveles de fragmentación del ADN espermático, siendo los resultados casi siempre

controvertidos. La mayoría de estos trabajos se han llevado a cabo con pacientes infértiles que acuden a clínicas de fertilidad y son escasos los trabajos que han explorado estas relaciones en otro tipo de poblaciones.

#### OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es analizar los factores que influyen en el índice de fragmentación de ADN espermático en varones jóvenes voluntarios sanos.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio transversal realizado en jóvenes universitarios sanos (18-23 años) de la Región

de Murcia (n=159) y llevado a cabo entre 2010 y 2011. Los participantes proporcionaron una muestra seminal, se les realizó un examen andrológico y cumplieron cuestionarios epidemiológicos sobre hábitos de vida. El análisis de la fragmentación del ADN espermático se realizó mediante el método de dispersión de la cromatina espermática (test SCD). El índice de fragmentación se definió como el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado con respecto al total de los espermatozoides analizados. Para cada muestra se estudiaron 300 espermatozoides. Los determinantes a estudiar se relacionaron con: a) características de la muestra seminal (tiempo de abstinencia sexual, estación del año), b) examen físico

(obesidad, presencia de varicocele) y c) hábitos de vida (consumo de tabaco, alcohol, cafeína, estrés y ejercicio físico). Se utilizó la correlación de Pearson, el test de chi-cuadrado o el análisis de la varianza (ANOVA) para analizar las relaciones entre los distintos factores y el porcentaje de fragmentación de ADN espermático. El nivel de significación estadística se fijó en 0.05 y el paquete estadístico utilizado fue el SPSS 19.0.

### RESULTADOS

La media y desviación estándar del índice de fragmentación fue del 28.6%±14.7. Las muestras obtenidas en otoño y en

invierno presentaron un menor índice de fragmentación de ADN espermático que las obtenidas en el resto de las estaciones (pvalores<0.05). El tiempo de abstinencia sexual, la obesidad o la presencia de varicocele no se asociaron con los niveles de fragmentación espermática. Con respecto a los hábitos de vida, el consumo de alcohol de alta graduación (whisky, etc.) se asoció con una mayor fragmentación de ADN espermático, mientras que el consumo de café y bebidas con cafeína se relacionó con un menor porcentaje de fragmentación (p valores <0.05). No se observó ninguna asociación entre la fragmentación de ADN y el consumo de alcohol de baja graduación, como vino o cerveza, o el resto de las variables estudiadas.

### CONCLUSIONES

Nuestros resultados concuerdan parcialmente con otros estudios publicados hasta el momento sobre la fragmentación del ADN espermático en varones, sugiriendo que los factores que determinan el grado de la fragmentación pueden variar en función de la muestra o del tipo de población estudiada. El consumo de cafeína, alcohol de alta graduación y la estacionalidad se han mostrado como posibles determinantes del porcentaje de fragmentación del ADN espermático. Estos resultados abren la puerta a futuros estudios de intervención donde se pueda confirmar el efecto de estos factores sobre los niveles de fragmentación del ADN espermático.

## P-130: ESTUDIO COMPARATIVO MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO DE DOS MEDIOS DE CONGELACIÓN DE SEMEN: FREEZING MEDIUM (IRVINE) VS CRYOPROTECT II (NIDACON)

G. López Granollers<sup>2</sup>; M. Fors<sup>1</sup>; J. Pérez<sup>1</sup>; G. López<sup>2</sup>; R. Lafuente<sup>2</sup>; M.A. Checa<sup>3</sup>; R. Carreras<sup>3</sup>; M. Brassesco<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Máster Medicina Reproductiva. Parc Salut Mar. UAB. Barcelona. <sup>2</sup> Laboratorio de Andrología. CIRH. Clínica Corachan. ANACER. Barcelona.

<sup>3</sup> Departamento de Obstetricia y Ginecología. Parc de Salut Mar. Barcelona

[glopez@cirh.es](mailto:glopez@cirh.es)

### INTRODUCCIÓN

La congelación de semen es una técnica imprescindible en cualquier centro de Reproducción Asistida. Se utiliza tanto para congelar las muestras de donantes como de pacientes que van a someterse a una FIV. También se congelan muestras con el fin de preservar la calidad espermática en pacientes que van a recibir quimioterapia o pacientes que van a realizarse una vasectomía. El proceso de congelación de semen supone un estrés para las células, que puede afectar a la viabilidad celular. Para evitarlo, es importante elegir el protocolo de congelación que menos dañe a nuestras células. Además nos interesa conocer el posible daño provocado en la muestra capacitada justo antes de aplicar la técnica de Reproducción Asistida.

### OBJETIVOS

Comparar diferentes parámetros seminales en muestras capacitadas tras criopreservación con dos medios distintos.

### MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio prospectivo se realiza con 10 muestras de semen con valores normales según la OMS 2010. Se realiza un seminograma inmediatamente después de la eyaculación, y el volumen obtenido se divide en dos fracciones.

Una mitad es congelada sin capacitar con Freezing Medium (Irvine), siguiendo el protocolo del fabricante. Días más tarde, se procede a su descongelación y se capacita en gradientes de densidad (80% y 40%), analizando los diferentes parámetros.

La otra fracción se capacita antes de congelar con gradientes de densidad (80% y 40%). La muestra capacitada se congela con Cryoprotect II (Nidacón), según protocolo del fabricante. Días más tarde, se descongelan las muestras y se procede a su análisis.

Las determinaciones realizadas antes y después de congelar con cada una de las fracciones son: concentración y movilidad progresiva; mediante citometría de flujo (MACSQuantAnalyzer, MiltenyiBiotec) se determinan el índice de fragmentación del ADN mediante SCSA, porcentaje de apoptosis con anexina V-FITC y porcentaje de vitalidad con yoduro de propidio. Se comparan los resultados obtenidos postcongelación y postcapacitación con cada uno de los medios. Se utiliza el programa estadístico SPSS, prueba de T-Test para muestras apareadas.

## RESULTADOS

La concentración espermática y la movilidad progresiva no presentan diferencias estadísticamente significativas entre los medios crioprotectores utilizados ( $p=0,103$  y  $p=0,939$  respectivamente).

El proceso de capacitación después de la congelación con Freezing Medium aumenta la fragmentación del ADN de forma estadísticamente significativa ( $p=0,006$ ), cosa que no ocurre con el Cryoprotect II. Comparando los dos protocolos de congelación se observan diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,018$ ).

El porcentaje de espermatozoides apopóticos vivos disminuye significativamente en ambos protocolos después de descongelar ( $p=0,008$ ) pero no hay diferencias estadísticamente significativas entre ambas técnicas ( $p=0,173$ ). Por contra aumenta significativamente el porcentaje de apoptóticos totales postcongelación en los dos medios ( $p=0,000$   $p=0,032$ ) pero no existen diferencias significativas entre ellos ( $p=0,097$ ).

Respecto al porcentaje de vitalidad, vemos que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los dos medios ( $p=0,21$ ), aunque con el Freezing Medium se recuperan un porcentaje más alto de espermatozoides vivos.

Respecto al porcentaje de vitalidad, vemos que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los dos medios ( $p=0,21$ ), aunque con el Freezing Medium se recuperan un porcentaje más alto de espermatozoides vivos.

## CONCLUSIONES

Los resultados preliminares muestran que aplicando un protocolo u otro, los parámetros estudiados no varían

significativamente excepto el porcentaje de fragmentación. Este valor aumenta si congelamos la muestra sin capacitar con Freezing Medium y se capacita después de descongelar. La capacitación realizada después de la congelación con Freezing Medium podría ser menos eficiente, ya que se detecta que la media de concentración de espermatozoides recuperados es inferior que con el protocolo del Cryoprotect II.

Por lo tanto parece más apropiado congelar las muestras con Cryoprotect II ya que afecta menos a la fragmentación del ADN, pero hay que tener en cuenta que el aumento observado en la fragmentación no sobrepasó el valor de normalidad establecido en la mayoría de casos.

Esperamos aportar más casos para poder corroborar los resultados preliminares.

# P-131: PERFIL DE LA PACIENTE DE FIV CON BAJA RECUPERACIÓN DE OVOCITOS

N. Prados; V. Blasco; R. Quiroga; F. Cruz; D. Galliano; A. Pellicer; M. Fernández  
 Clínica IVI Sevilla, Sevilla  
[victor.blasco@ivi.es](mailto:victor.blasco@ivi.es)

## INTRODUCCIÓN

En determinados casos, el número de ovocitos que se obtiene tras la punción folicular es menor al esperado en base a los niveles de estradiol medidos el día de la administración de hCG o al número de folículos con un diámetro de 10 o más mm visualizados mediante ecografía. Actualmente no existen unos criterios objetivos que nos permitan establecer cuando puede ser considerado anómalo el número de ovocitos que se obtienen tras una punción folicular por ser inferior a lo esperado.

## OBJETIVOS

El objetivo de este estudio es determinar unos valores límite que permitan establecer cuando es anómalo el número de ovocitos recuperados tras una punción y el número de ovocitos

maduros (metafase II) obtenidos respecto a lo esperado por estradiol o ecografía.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se han analizado de forma retrospectiva un total de 2351 punciones foliculares realizadas en las clínicas IVI Valencia, IVI Barcelona e IVI Sevilla durante el año 2012. En todos los casos se recogieron los siguientes datos: niveles de estradiol y progesterona medidos el día de la administración de la hCG, número de folículos medidos por ecografía y sus diámetros en mm, número de ovocitos obtenidos tras la punción y número de ovocitos maduros. Se realiza un análisis estadístico descriptivo de los datos y las distintas regresiones. Se consideran significativas probabilidades menores del 5%.

## RESULTADOS

El nivel de estradiol se correlaciona mejor con el número de ovocitos recuperados ( $R^2 = 52\%$ ) que con el número de ovocitos maduros ( $R^2 = 46\%$ ). El nivel de progesterona no se correlaciona con el número de ovocitos recuperados o el número de ovocitos maduros ( $R^2 = 0.1\%$  en ambos casos). El número de folículos de 10 o más mm es el parámetro que mejor predice el número de ovocitos recuperados ( $R^2 = 73.5\%$ ,  $p = 0.001$ ), mientras que el número de folículos de 12 o más mm es lo que mejor predice el número de ovocitos maduros obtenidos ( $R^2 = 59.5\%$ ,  $p = 0.001$ ). De acuerdo a esta correlación, se recupera 1 ovocito por cada 166.66 pg de estradiol en sangre y 0.937 ovocitos por cada folículo de 10 o más mm observado por ecografía. En cuanto a los análisis descriptivos con

percentiles, en el 5% de las punciones estudiadas se ha recuperado menos del 35% de los ovocitos esperados de acuerdo a los niveles de estradiol y menos del 35% de los esperados en base al número de folículos de 10 o más mm observados por ecografía. Respecto al número de ovocitos maduros obtenidos en todas aquellas punciones en las que se han recuperado 6 o más ovocitos, en el 95% de los casos se ha obtenido

un 50% o más de ovocitos maduros, mientras que en un 70% de los casos se obtiene una proporción de ovocitos maduros mayor o igual al 70%.

#### CONCLUSIONES

Por un lado, podríamos considerar como anormal una recuperación de ovocitos cuando se obtienen menos del 35% de los que se esperaban de acuerdo tanto

al nivel de estradiol como al número de folículos. Por otro lado, consideraríamos anormal el número de ovocitos maduros obtenidos cuando menos del 50% de los ovocitos recuperados son inmaduros. Estos criterios podrían resultar útiles en la práctica clínica habitual de los centros de reproducción asistida para catalogar los ciclos como anómalos y prever si se trata de un patrón que se repite en los ciclos sucesivos de una paciente.

## P-132: EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A PESTICIDAS PERSISTENTES EN LA CALIDAD SEMINAL: UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

M.C. Gonzalvo López; M. Serrano; A. Clavero; M.F. Fernández; M.L. López; I. Orozco; A. Mantilla; J. Mozas  
Unidad de Reproducción del Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada  
[serranomolinamaria@gmail.com](mailto:serranomolinamaria@gmail.com)

#### INTRODUCCIÓN

Los pesticidas son un amplio grupo de sustancias biológicamente activas utilizadas para el control de plagas que pueden afectar a la salud humana. La exposición de humanos a los pesticidas puede ocurrir tanto por la aplicación en la agricultura e industria (exposición ocupacional), como por la contaminación de suelos, polvo sobre la ropa de trabajo, agua y alimentos, entre otros (exposición ambiental). Entre los efectos biológicos de los pesticidas persistentes se ha prestado atención en los últimos años a los efectos sobre el sistema reproductivo. Pequeñas cantidades de algunos de estos productos químicos pueden reducir la capacidad de reproducción siendo la función reproductiva masculina altamente sensible a muchos agentes físicos y químicos generados por las actividades industriales agrícolas.

#### OBJETIVOS

El objetivo de esta revisión es determinar si la calidad seminal se ha visto afectada por la exposición a pesticidas persistentes y si existen diferencias entre los diferentes tipos de exposiciones y si se relacionan estos hallazgos con la calidad del estudio medida mediante la guía SEMQUA.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó una revisión bibliográfica sobre la exposición a pesticidas persistentes y su efecto en la calidad seminal. Se revisaron 46 trabajos, 26 sobre exposición ocupacional (56,5%) y 20 sobre exposición ambiental (43,5%) de los que se recopilamos datos sobre los parámetros de calidad seminal, volumen, concentración, morfología y movilidad espermática. Categorizando cada uno de estos parámetros en dos variables categóricas, calidad seminal alterada y calidad seminal no alterada.

#### RESULTADOS

El porcentaje de estudios en los que disminuyen el volumen, la concentración, la morfología y la movilidad espermática es del 14%, 76%, 43%, 64%, respectivamente. Siendo la concentración espermática el parámetro de calidad seminal más estudiado, el 91% de los estudios lo evalúan frente al 46%, 61% y 61% de estudios que miden volumen, morfología y movilidad espermática. No se observa relación entre el año de la publicación y la alteración de la calidad seminal. Se observa una relación entre la baja calidad del diseño y metodología

de los estudios de calidad seminal (< 50% del grado de cumplimiento de la guía SEMQUA) y la alteración en la concentración espermática ( $\chi^2= 10,6$ ;  $p<0.01$ ) para el resto de parámetros seminales esta relación no es significativa.

#### CONCLUSIONES

Son necesarios nuevos estudios sobre el efecto de los pesticidas persistentes en la calidad seminal desarrollados a partir de una buena metodología estandarizada para poder asociar la alteración de los parámetros de calidad seminal con la exposición a pesticidas persistentes.

## P-133: ACTUALIZACIÓN CON LOS RESULTADOS DEL REGISTRO SEF 2010 DE LOS ESTÁNDARES DE LOS INDICADORES DE CALIDAD DEL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN DE ASEBIR

I. Orozco; F. Prados; S. Zamora; E. Vidal; Y. Cabello; N. Ortiz; M.J. de los Santos, A. González-Útor; J.A. Castilla.  
Registro SEF en colaboración con ASES, ASEBIR Y SEGO. Comisión de calidad de ASEBIR. Granada  
[inmaculadaorozcoflores@gmail.com](mailto:inmaculadaorozcoflores@gmail.com)

### INTRODUCCIÓN

La gestión de la calidad incluye tanto la garantía como la planificación, así como el control de calidad estadístico que se debe realizar cada día.

Pretendemos que todas las actividades realizadas en el laboratorio permitan a los clínicos practicar una buena medicina centrada en los pacientes. Antes de controlar, practicar, asegurar o mejorar la calidad del laboratorio, debemos conocer qué indicadores y qué nivel de calidad es necesario para asegurar que el servicio sea satisfactorio.

Un indicador de calidad es un instrumento de medida que refleja la cantidad de calidad que posee una actividad o servicio, ayuda a identificarla y a observar la evolución del proceso, facilitando la comparación entre diferentes servicios de un mismo sector a lo largo del tiempo. ASEBIR ha definido indicadores de calidad para el laboratorio de reproducción, y ha diseñado estrategias para la elaboración de estándares para estos.

### OBJETIVOS

En este trabajo pretendemos actualizar los estándares para los indicadores propuestos por ASEBIR para los laboratorios de Reproducción.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Para establecer los Estándares de Calidad se utilizaron los datos del Registro de Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), único registro nacional sobre TRA y validado por el Ministerio de Sanidad, realizado en colaboración con ASES, ASEBIR y SEGO.

Se utilizaron los datos de aquellos laboratorios que realizaron más de 30 ciclos de FIV/ICSI en el año 2010. Las técnicas estudiadas fueron los ciclos de FIV/ICSI con ovocitos propios y donados, criopreservación de embriones, DGP con embriones en fresco e Inseminación Artificial.

Se definen 3 niveles para los estándares: Mínimo: alcanzado por el 95% de los laboratorios participantes en el registro SEF. Deseable: alcanzado por el 75% de los laboratorios. Óptimo: alcanzado por el 25% de los laboratorios.

Los indicadores estudiados fueron: Porcentaje de fecundación normal, Tasa de supervivencia embrionaria, Porcentaje de gestación clínica por transferencia, Porcentaje de gestación clínica en inseminación artificial, Número de embriones transferidos por embarazo, Tasa de implantación embrionaria y Porcentaje de embriones utilizados.

### RESULTADOS

Los estándares obtenidos a nivel deseable en 2010 para los indicadores de calidad estudiados fueron similares a los de 2009, excepto para la tasa de gestación clínica por criotransferencia con ovocitos donados (30.8% en 2010 frente a 22.5% en 2009) y la tasa de implantación embrionaria en transferencia de embriones criopreservados de ovocitos donados (20.0% en 2010 frente a 9.6% en 2009). Algunos intervalos de confianza de los niveles de calidad de un mismo estándar se solapan, lo que es debido a que se disponía de datos de menos de 75 centros para el cálculo de dicho estándar. Se observa una bajada en el porcentaje de embriones utilizados con ovocitos de donante respecto al año 2009.

### CONCLUSIONES

Los cambios observados en los estándares de los indicadores relacionados con los programas de criopreservación reflejan que el método de cálculo es sensible a las mejoras técnicas que ha supuesto la incorporación de la vitrificación en los últimos años. La bajada del porcentaje de embriones utilizados con ovocitos de donante puede explicarse asumiendo que los centros cada vez congelan menos embriones en programas de donación de ovocitos, fenómeno que no se observa en programas con ovocitos propios. Para aumentar la precisión del método de cálculo es preciso aumentar la participación de centros en el Registro SEF.



## P-134: ¿LA CONGELACIÓN DE EMBRIONES SOBRAINTES EN ESTADIO DE BLASTOCISTO PREDICE GESTACIÓN?

M. Sánchez; C. Álvarez; C. García; M. A. Roque; G. González  
Hospital General Universitario de Albacete, Albacete  
[marisancheztoledo@hotmail.com](mailto:marisancheztoledo@hotmail.com)

### INTRODUCCIÓN

Los ciclos de fecundación *in vitro* (FIV), dan lugar a un exceso de embriones tras la transferencia que van dirigidos al programa de congelación establecido por cada laboratorio. Los embriones pertenecientes a una misma cohorte pueden tener un comportamiento similar, de modo que el estudio del desarrollo de los "sobrantes", aquellos que no cumplen los criterios para ser transferidos en estadios tempranos, puede aportar información sobre el comportamiento de los embriones transferidos y sobre el resultado del ciclo de FIV.

### OBJETIVO

Analizar si existe relación entre la evolución hasta blastocisto y posterior vitrificación de los embriones "sobrantes" en un ciclo de FIV y los resultados de la transferencia en día 2/3.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio retrospectivo incluye un total de 202 parejas sometidas a tratamiento de ICSI que obtuvieron embriones "sobrantes" tras la transferencia en día 2/3. El exceso de embriones se cultivó hasta blastocisto para evaluar si eran aptos para vitrificación. Dividimos el trabajo en dos estudios.

#### ESTUDIO 1

Grupo 1 (n=94): Pacientes que congelaron embriones sobrantes tras la transferencia.

Grupo 2 (n=108): Pacientes que no congelaron ningún embrión sobrante tras la transferencia.

#### ESTUDIO 2:

Grupo A (n=28) Pacientes que congelaron blastocistos de calidad óptima (tipo A y B).

Grupo B (n=66) Pacientes que congelaron blastocistos de calidad subóptima (tipo C).

En ambos estudios se comparó: la edad media de las pacientes, el número de ovocitos obtenidos y el de ovocitos maduros (MII), el número de embriones transferidos, el número de embriones óptimos totales el día de la transferencia y el número de embriones óptimos transferidos, tasa de fecundación, tasa de  $\beta$ hCG positiva y de gestación.

### RESULTADOS

En el **estudio 1**, el número de ovocitos ( $11,66 \pm 5,33$  vs  $8,65 \pm 3,70$ ;  $p=0,000$ ), el número de ovocitos maduros ( $9,59 \pm 4,45$  vs  $7,19 \pm 3,13$ ;  $p=0,000$ ), la tasa de fecundación ( $75,73 \pm 16,97$  vs  $70,18 \pm 18,16$ ;  $p=0,027$ ), el número de embriones óptimos totales ( $1,06 \pm 1,67$  vs  $0,29 \pm 0,55$ ;  $p=0,000$ ) y la calidad de los embriones transferidos ( $0,73 \pm 0,86$  vs  $0,29 \pm 0,55$ ;  $p=0,000$ ) fue mayor en el grupo 1. Sin embargo en el grupo 2 se transfirió un número mayor de embriones ( $2,02 \pm 0,36$  vs  $2,16 \pm 0,44$ ;  $p=0,017$ ). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en la edad media de las pacientes ( $34,08 \pm 3,61$  vs  $34,87 \pm 3,45$ ;  $p=0,140$ ), tasa de  $\beta$ hCG positiva ( $45,70\%$  vs  $40,70\%$ ;  $p=0,283$ ) y tasa de gestación ( $41,50\%$  vs  $35,20\%$ ;  $p=0,219$ ) entre los grupos.

En el **estudio 2**, no se encontraron diferencias significativas en la edad media de las pacientes ( $34,64 \pm 3,09$  vs  $33,84 \pm 3,80$ ;  $p=0,408$ ), número de ovocitos obtenidos ( $11,93 \pm 5,27$

vs  $11,55 \pm 5,39$ ;  $p=0,515$ ), número de ovocitos maduros ( $10,14 \pm 4,64$  vs  $9,35 \pm 4,39$ ;  $p=0,348$ ), número de embriones transferidos ( $2,04 \pm 0,331$  vs  $2,02 \pm 0,372$ ;  $p=0,803$ ) y tasa de fecundación ( $74,37 \pm 14,38$  vs  $76,31 \pm 18,03$ ;  $p=0,556$ ). Sin embargo, el número de embriones óptimos totales ( $1,79 \pm 2,38$  vs  $0,76 \pm 1,15$ ;  $p=0,006$ ) así como la calidad de los embriones transferidos ( $1,04 \pm 0,79$  vs  $0,61 \pm 0,86$ ;  $p=0,012$ ) fue mayor en el grupo que congeló blastocitos óptimos. Igualmente, la tasa de  $\beta$ hCG positiva ( $60,7\%$  vs  $39,4\%$ ;  $p=0,047$ ) y de gestación ( $57,1\%$  vs  $34,8\%$ ;  $p=0,038$ ) fue mayor en este grupo (Grupo A).

### CONCLUSIONES

- Los embriones sobrantes tras la transferencia nos ofrecen la oportunidad de estudiar el desarrollo *in vitro* de la cohorte embrionaria.
- Las pacientes con embriones óptimos el día de la transferencia tienen más posibilidades de congelar embriones en estadio de blastocisto.
- Las pacientes que se transfieren embriones en fresco tienen mayor posibilidad de gestación, si alguno de los embriones "sobrantes" alcanza el estadio de blastocisto de calidad óptima.

## P-135: USO CLÍNICO DE LA FISH EN ESPERMATOZOIDES. ESTUDIO MULTICENTRICO ANACER

J.M. Moreno<sup>1,2</sup>, C. García-Ochoa<sup>3,2</sup>, F. Marina<sup>4,2</sup>, M. Ruiz<sup>5,2</sup>, R. Lafuente<sup>6,2</sup>, F. Graña<sup>3,2</sup>, R. Núñez<sup>7</sup>, J. Ten<sup>8</sup>, J. Blanco<sup>9</sup>, J. Rueda<sup>10,2</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Reproducción Clínica Vistahermosa. Alicante, <sup>2</sup> Asociación Nacional de Clínicas de Reproducción Asistida (ANACER), <sup>3</sup> CEFIVA. Asturias, <sup>4</sup> CEFER. Barcelona, <sup>5</sup> CREA. Valencia, <sup>6</sup> CIRH. Barcelona, <sup>7</sup> Clínica Tambre. Madrid, <sup>8</sup> Instituto Bernabéu. Alicante, <sup>9</sup> Unidad de Biología Celular. Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra, <sup>10</sup> Unidad de Genética Clínica Vistahermosa. Universidad Miguel Hernández. Alicante [lab@urvistahermosa.com](mailto:lab@urvistahermosa.com)

### INTRODUCCIÓN

Un 30% de los problemas de infertilidad lo son por causas genéticas, algo más de la mitad de ellas con origen en el varón. En un porcentaje alto de ocasiones, estas alteraciones genéticas se originan por defectos de la meiosis, lo que da lugar a cambios en el seminograma o a la presencia de aneuploidies. Ambas situaciones provocan disminución de las tasas de éxito de TRAs.

### OBJETIVO

El estudio multicéntrico que se presenta ha tenido como objetivo general conocer la utilidad clínica del estudio FISH en espermatozoides, por la oportunidad de aunar los datos de laboratorio con datos clínicos de diagnóstico de la pareja y de resultados de los procesos reproductivos. El objetivo de la comunicación es comprobar el impacto que las anomalías en la espermatogénesis, estudiadas mediante el FISH, tienen sobre el seminograma, los resultados de ciclos de FIV/ICSI y el impacto en el DGP.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado 593 casos (51 de DGP) de parejas infértiles varones con factor masculino, de siete centros de reproducción asistida. De cada caso se han obtenido los datos del seminograma, edad, tasas de fecundación, calidad embrionaria, gestación y aborto. En todos los varones se ha realizado una FISH con sondas para los cromosomas 13, 18, 21, X e Y. El análisis estadístico se ha realizado con pruebas no paramétricas. Para las correlaciones, se ha usado el coeficiente de correlación de Spearman. Para los análisis del resultado de la FISH entre grupos, se han calculado las significaciones a partir de un test basado en la distribución binomial.

### RESULTADOS

El 25% de los casos estudiados tienen un estudio de FISH de espermatozoides alterado. La edad no es un factor de riesgo para el incremento de aneuploidías, al menos en la población

estudiada. El recuento espermático y la morfología están correlacionados con FISH alterada, no así las alteraciones de la motilidad. En los casos en los que hay FISH alterado, la calidad embrionaria es peor (embriones A+B 36,87% vs 55,42), hay menores tasas de fecundación (62,21% vs 67,55%) y gestación (42,39% vs 52,41%) y mayores tasas de aborto (17,95% vs 17,11%). Los embriones derivados de varones con FISH alterado muestran un aumento de aneuploidías (65,28% vs 56,16%).

### CONCLUSIONES

Se concluye que el estudio FISH en espermatozoides identifica varones en riesgo genético para la descendencia y está especialmente indicado en varones con parámetros seminales alterados, sobre todo con bajo recuento espermático y mala morfología. Las parejas en las que el varón tiene un FISH de espermatozoides alterado tienen menores tasas de éxito en el proceso reproductivo.

## P-136: RESULTADOS DE TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA CON SELECCIÓN ESPERMÁTICA MEDIANTE COLUMNAS DE ANEXINA EN UN PROGRAMA DE FIV/ICSI

AP. Ortiz Velasco; B. López; J.C. Alberto; M. Correa.

Centro de Endocrinología de la Reproducción de Tenerife – CERT. Santa Cruz de Tenerife. Santa Cruz de Tenerife.

[biologia@cert.es](mailto:biologia@cert.es)

### INTRODUCCIÓN

La presencia de una elevada cantidad de espermatozoides apoptóticos tiene un efecto negativo en los resultados

de reproducción asistida, estando relacionada con unas menores tasas de fecundación e implantación. La externalización de fosfatidil serina en la membrana plasmática, debido a

la pérdida de integridad de la misma, es una propiedad característica de espermatozoides pre-apoptóticos que puede ser aprovechada para poder detectarlos y separarlos mediante el

uso de columnas de anexina previo a un tratamiento de FIV/ICSI.

### OBJETIVOS

Analizar el efecto de la selección espermática solo mediante gradientes de densidad o en combinación de gradientes de densidad y columnas de anexina sobre la tasa de fecundación y gestación en pacientes de un programa de FIV/ICSI.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio en el que participaron 40 parejas pertenecientes a nuestro programa de FIV/ICSI durante el periodo comprendido entre Enero de 2012 y Abril de 2013. Se analizaron un total de 44 muestras de semen que se dividieron en 2 grupos en base a la calidad seminal. En el grupo 1 (n= 28) las muestras seminales, todas ellas

normozoospermicas, se procesaron solo mediante gradientes. En el grupo 2 (n= 16), formado por muestras de mala calidad seminal según criterio de la OMS (oligo, asteno y/o teratozoosémicas), el pellet obtenido tras la técnica de gradientes fue incubado con Binding Buffer y el reactivo Annexin V. La suspensión se dejó eluir por la columna obteniendo la fracción negativa, la cual contiene un alto porcentaje de espermatozoides no apoptóticos. A continuación se llevó a cabo la microinyección intracitoplasmática en ambos grupos y se compararon las diferencias en las tasas de fecundación y de gestación.

### RESULTADOS

El porcentaje de fecundación para ambos grupos fue 62,55% para el grupo 1 y 68,59% para el grupo 2. Los valores obtenidos no son significativamente

diferentes ( $p= 0,687$ ), lo cual fue determinado mediante el test estadístico de la t de Student. En cuanto al porcentaje de gestación, se obtuvieron los valores de 2,3% para el grupo 1 y 6,8% para el grupo 2, obtenidos mediante tablas de contingencia.

### CONCLUSIONES

Los resultados existentes en la literatura actual muestran que la selección espermática mediante el uso de columnas de anexina disminuye la población espermática con daños apoptóticos tempranos. De acuerdo con ello, este estudio indica una leve mejora en los porcentajes de fecundación y gestación en muestras seminales procesadas mediante esta técnica. Sin embargo, serán necesarios estudios clínicos más amplios y con mayor tamaño muestral, que puedan determinar diferencias significativas en dichas tasas.

## P-137: ESTUDIO DE LA FRAGMENTACIÓN DEL DNA ESPERMÁTICO EN PACIENTES CON VIH MEDIANTE TINCIÓN DIFF-QUIK

A. Clavero; I. Orozco; M.C. Gonzalvo; M.L. López; S. Carrillo; B. López; M. Serrano; A. Mantilla.  
Unidad de Reproducción del H. Virgen de las Nieves, Granada, Granada.  
[inmaculadaorozcoflores@gmail.com](mailto:inmaculadaorozcoflores@gmail.com)

### INTRODUCCIÓN

Ha sido muy debatido el efecto del VIH sobre los parámetros seminales según los valores de referencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Hay muchas pruebas que muestran que los parámetros seminales estándares como la concentración espermática, morfología y movilidad no pueden predecir resultados de fertilidad y que únicamente indican una determinada calidad seminal y funcionamiento del tracto reproductivo masculino.

La integridad del ADN nuclear espermático es necesaria para una correcta transmisión de la información genética paterna y existe consenso respecto a la correlación negativa

entre la fragmentación del ADN espermático y la tasa de embarazo y/o desarrollo embrionario. La fragmentación del ADN espermático se considera un buen marcador de la infertilidad masculina.

Los ensayos para evaluar el daño en el ADN espermático son caros y requieren mucho tiempo, por lo que difícilmente se incluyen en la rutina de un laboratorio de andrología.

Se está desarrollando un método simple y rápido para el estudio del estado del ADN espermático. El ensayo utiliza la tinción Diff-Quick y se basa en la intensidad de coloración alcanzada por los núcleos, de manera que cabezas teñidas con tonalidad clara indicaría estado normal del ADN, mientras que

cabezas teñidas con tonalidad muy intensa indicarían daño en el ADN.

### OBJETIVOS

Este estudio pretende analizar la fragmentación del ADN espermático en pacientes con VIH, así como distintos parámetros de calidad seminal y comparar los resultados con los obtenidos en donantes libres de dicha enfermedad infecciosa.

### MATERIAL Y MÉTODOS

La población de estudio son pacientes VIH con carga viral indetectable en plasma, bajo triple terapia que incluya 2 análogos de nucleósidos/nucleótidos y que sean subsidiarios de pasar a monoterapia con un inhibidor de la

proteasa potenciado, mayores de 18 años y con un consentimiento informado por escrito firmado. El grupo control lo constituyeron 17 jóvenes candidatos a donantes de nuestro banco de semen, durante el tiempo que duró el estudio.

Una vez obtenida la muestra de semen se lleva a cabo su análisis, siguiendo las indicaciones y protocolos del manual de la OMS 2010, en un laboratorio específico, con una cabina de seguridad biológica de clase II.

Los parámetros estudiados son: pH, volumen, licuefacción, viscosidad, ensayo de anticuerpos anti-espermatozoides (MAR test), movilidad, concentración de espermatozoides, concentración de células redondas,

vitalidad, morfología (incluyendo índice de teratozoospermia (ITZ)) y fragmentación del ADN.

Para el estudio de la morfología, ITZ y fragmentación (parámetros estudiados todos en la misma extensión teñida) utilizamos una tinción tipo Diff-Quik, siguiendo un protocolo ligeramente diferente al indicado por el manual de la OMS.

#### RESULTADOS

Tras realizar el análisis de los datos observamos valores de concentración de espermatozoides de 85 millones por mililitro, una movilidad progresiva de un 50%, morfología correcta del 4% y vitalidad del 87%, entre

otros parámetros. Los resultados del estudio de la fragmentación del ADN llegan al 49%. No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de estudio y el grupo control en los parámetros seminales analizados ni en el porcentaje de fragmentación de ADN espermático.

#### CONCLUSIONES

Los varones en tratamiento antiretroviral potente con infección VIH estable no presentan alterada su calidad seminal ni tienen aumentado el porcentaje de fragmentación de ADN espermático, siendo candidatos para la reproducción natural en caso de elegir esta opción reproductiva.

## P-138: RELACIÓN DE LA FRECUENCIA EYACULATORIA RESPECTO A LA CALIDAD SEMINAL

P. Ibáñez, A. Brotons, A.A. Fernández-Peinado, A. Moya-Yeste  
Clínica In Vitam Centro de Medicina Reproductiva. Elche. Alicante  
[info@invitam.es](mailto:info@invitam.es)

#### INTRODUCCIÓN

La frecuencia de eyaculación puede repercutir sobre la calidad seminal. Está comprobado que una mayor frecuencia eyaculatoria disminuye el daño en el ADN del espermatozoide (Greening., 2009).

#### OBJETIVOS

Aumentar la n del estudio que comenzamos en nuestro centro en el 2010 donde nos propusimos comparar la calidad seminal de varones con una mayor actividad sexual respecto al resto, para comprobar si existe mejoría en los parámetros seminales en aquellos individuos cuya actividad sexual es mayor.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

85 varones voluntarios se sometieron a un análisis de semen, cumplimentando previamente un cuestionario donde se les preguntó entre otras cuestiones

acerca de la frecuencia con la que eyaculaban semanalmente. Se pidió una abstinencia previa entre 3 y 5 días siguiendo los criterios de la OMS. Se agruparon en tres categorías según si el número de eyaculaciones era entre 1 y 3, 4 y 6, o más de 6 veces semanales. Posteriormente, se sometieron los resultados a un análisis estadístico (ANOVA), comparando los valores de los distintos parámetros seminales.

#### RESULTADOS

Los valores obtenidos muestran un aumento de la concentración según aumenta la frecuencia eyaculatoria. Las concentraciones medias eran de 76 M/ml en el grupo con frecuencia eyaculatoria alta, de 72 M/ml en el grupo intermedio y de 129 M/ml cuando se eyaculaba más de 6 veces a la semana (p-valor = 0,016)..

Se observó también una disminución del volumen a medida que se aumentaba el número de eyaculaciones semanales,

pero en este caso no tenemos diferencias estadísticamente significativas.

Además vemos, aunque tampoco de forma no significativa, que tanto un número reducido como un número muy elevado de eyaculaciones empeoran la movilidad progresiva de los espermatozoides.

#### CONCLUSIÓN

Aquellos varones con una vida sexual más activa ven mejorada su calidad seminal en cuanto a concentración espermática se refiere. Según aumenta la frecuencia eyaculatoria, el volumen del eyaculado resulta menor debido posiblemente al mayor gasto de plasma seminal, pues el intervalo de tiempo entre cada eyaculado es menor.

Nos encontramos trabajando aumentando la n de este estudio para intentar conseguir resultados estadísticamente significativos en todos los parámetros.

## P-139: DETERMINACIÓN CUALITATIVA DEL ANIÓN SUPERÓXIDO COMO PARÁMETRO DE ESTRÉS OXIDATIVO EN CÉLULAS ESPERMÁTICAS

A. Nicolich<sup>1</sup>, G. López<sup>2</sup>, R. Lafuente<sup>2</sup>, A. García-Peiró<sup>3,4</sup> y M. Brassesco<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Celular. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona, Barcelona. <sup>2</sup>CIRH. Clínica Corachán. ANACER, Barcelona. <sup>3</sup>Centro de Infertilidad Masculina y Análisis de Barcelona (Cimab, Campus de la UAB, Bellaterra (Cerdanyola del Vallés), Barcelona. <sup>4</sup>Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola del Vallés), Barcelona [aracelinv@gmail.com](mailto:aracelinv@gmail.com)

### INTRODUCCIÓN

Se sabe que el estrés oxidativo es una de las causas principales que afectan a la infertilidad masculina, ya sea afectando a los diferentes parámetros seminales (concentración, movilidad y morfología) o a la fragmentación del DNA. El estrés oxidativo está relacionado con una producción descontrolada de diferentes especies reactivas de oxígeno (ROS) causantes de un desequilibrio respiratorio, como el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o los radicales hidroxil. De ahí que cada vez aparezcan nuevas técnicas para analizar parámetros como el estrés oxidativo, asociados a una disminución de la calidad espermática y, consecuentemente, en el porcentaje de éxito.

### OBJETIVOS

En este trabajo nos centraremos en la determinación del anión superóxido mediante el test OxiSperm (Halotech, DNA<sup>®</sup>) en muestras procedentes de pacientes con problemas de infertilidad, con el objetivo de comprobar si existe alguna relación entre diferentes parámetros.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se han incluido un total de 69 pacientes que acuden al centro por infertilidad. Se analiza una muestra seminal de cada paciente valorando: edad, volumen, concentración, porcentaje de movilidad progresiva, vacuolización celular medida mediante alta magnificación (microscopio Leica AM6000), y determinación cualitativa del anión superóxido mediante el kit OxiSperm.

El seminograma se realiza mediante el sistema CASA con el analizador digital

MEII. En la magnificación de los espermatozoides se han considerado a los grupos con mayor grado de vacuolización (grado III+IV) y por tanto con peor pronóstico.

El kit OxiSperm se basa en la utilización de un Gel Reactivo (GR) que reacciona con el anión superóxido responsable del estrés oxidativo presente en el semen humano. En función de la concentración de anión superóxido, después de incubar la muestra+GR 45 minutos a 37 °C, se forma un precipitado de color variable desde el rosa al morado o negro. Este color define el grado de estrés oxidativo en 4 niveles de intensidad. El test ha de realizarse exclusivamente en muestras frescas.

Para llevar a cabo el estudio estadístico se ha utilizado el programa UNStat2 y el BoxPlot PRO (Universidad de Navarra).

### RESULTADOS

Se han incluido un total de 69 pacientes, de los cuales 15 mostraron un grado de oxidación bajo (N1), 15 presentaron un nivel normal (N2), 25 un nivel moderado (N3) y 14 un nivel alto (N4). El test indica que no hay asociación entre los niveles de estrés oxidativo con la edad ni con ninguno de los parámetros seminales analizados en el eyaculado.

### CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que la producción de ion superóxido no depende de ninguna de las variables estudiadas. Estos resultados también sugieren que el daño en el DNA espermático, que en estudios previos ha sido asociado al grado

de vacuolización, no depende de la producción de ion superóxido y podría tener su origen en una actividad nucleasa. De esta manera podemos considerar a la técnica del OxiSperm un método relevante para escoger la mejor forma de analizar aquellas muestras que presenten un grado de estrés oxidativo moderado/alto, en cuanto a la elección de la técnica y el tiempo que se tarda en procesarla.



## P-140: ¿CUÁL ES EL TIEMPO ADECUADO DE INCUBACIÓN QUE DEBE TRANSCURRIR ENTRE LA DESVITRIFICACIÓN Y LA TRANSFERENCIA?

E. Martínez, M. De Las Heras, I. Ausín, G. Barrenetxea, J. De Pablo.  
Quiron Bilbao, Bizkaia  
[emartinez.bil@quiron.es](mailto:emartinez.bil@quiron.es)

### INTRODUCCIÓN

La vitrificación de embriones es frecuente en los tratamientos de reproducción asistida por diferentes motivos: la salud de la paciente, embriones sobrantes, disrupción endometrial.... En la mayoría de los casos pese a ser embriones que no se han seleccionado para transferir son embriones de buena calidad, con una buena tasa de implantación.

Existen pocas referencias en la bibliografía al respecto del intervalo de tiempo ideal que debe transcurrir entre la desvitrificación y la transferencia embrionaria, de modo que en el caso de observar diferencias deberían protocolizarse ambos procesos, con el objetivo de obtener los mejores resultados posibles.

### OBJETIVOS

Con este estudio queremos comprobar si el estrés que sufren los embriones con los procesos de vitrificación y desvitrificación se reduce cuando se cultivan un determinado tiempo en el incubador antes de ser transferidos. Veremos por lo tanto si la tasa de embarazo aumenta o no en función del número de horas que se dejan reposar los embriones.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio retrospectivo y randomizado. Incluye 281 pacientes en tratamiento, con transferencia de embriones vitrificados.

Se registró la hora exacta de la desvitrificación y de la transferencia. En función de la diferencia de horas se clasificaron en tres grupos: Grupo 1 (84 pacientes) menos de 4 horas de incubación, Grupo 2 (114 pacientes) entre 4 y 5 horas de incubación y Grupo 3 (83 pacientes) con más de 5 horas de incubación.

La calidad embrionaria fue evaluada según los criterios de ASEBIR (Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción).

Se ha utilizado en test  $\chi^2$  para analizar los resultados estadísticos.

### RESULTADOS

Las tasas de embarazo de acuerdo con el número de horas de incubación son 33.3% para el cultivo de menos de 4 horas, 30.7% para el cultivo entre 4 y 5 horas, y 38.5% para el cultivo de más de 5 horas. No se han encontrado

diferencias significativas entre las tasas de embarazo ( $p=0.774$ ).

La edad media de las pacientes también se ha registrado siendo 35.36, 35.58 y 34.58 para los grupos 1, 2 y 3 respectivamente.

Tanto la calidad como el número de embriones transferidos también ha resultado similar entre los tres grupos, siendo este última 1.45 vs 1.48 vs 1.45, respectivamente.

### CONCLUSIONES

Son pocos los estudios que tratan sobre este tema. El protocolo de desvitrificación según los medios de *Kitazato*, sistema de *Cryotop*®, no especifica un período de incubación determinado antes de transferir los embriones. De hecho no se conoce cuantas horas son necesarias para que se reactive el metabolismo embrionario. En conclusión dejar los embriones en el incubador menos de 4 horas antes de la transferencia no hace que disminuya la tasa de embarazo clínico y cultivarlos más de 5 horas tampoco parece producir ningún efecto beneficioso.

## P-141: ESTUDIO PRELIMINAR DEL EFECTO DEL TABACO SOBRE LA CALIDAD SEMINAL.

P. Ibáñez, A. Brotons, A.A. Fernández-Peinado, A. Moya-Yeste  
Clínica In Vitam Centro de Medicina Reproductiva. Elche. Alicante  
[info@invitam.es](mailto:info@invitam.es)

### INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides se generan mediante un proceso llamado

espermatogénesis. El humo del cigarro posee sustancias tóxicas como por ejemplo los hidrocarburos aromáticos policíclicos que intervienen activando

las enzimas del citocromo P450, interfiriendo en la producción de esteroides sexuales y alterando de este modo la espermatogénesis.

**OBJETIVOS**

Comparar la calidad seminal de varones fumadores respecto a los no fumadores, evaluando un posible empeoramiento en los parámetros seminales.

**MATERIAL Y MÉTODOS**

109 varones voluntarios se sometieron a un análisis de semen, cumplimentando previamente un cuestionario donde se les preguntó entre otras cuestiones si eran fumadores y en caso afirmativo, la cantidad de cigarrillos fumados semanalmente. Todos los voluntarios guardaron un periodo de abstinencia previo de entre 3 y 5 días. Se sometieron los resultados a un análisis estadístico (ANOVA), comparando los valores de los distintos parámetros seminales. Por un lado se agruparon los datos en

dos grupos: fumadores y no fumadores; y posteriormente se realizó un análisis más exhaustivo clasificando a los voluntarios en 3 grupos: no fumadores, fumadores moderado (de 1 a 70 cigarrillos semanales) y gran fumador (a partir de 71 cigarrillos semanales).

**RESULTADOS**

En el primer análisis, donde se clasifican a los individuos en dos grupos (fumador y no fumador) se observa una disminución significativa de la concentración espermática (p-valor = 0,001). En el grupo no fumador la concentración media fue de 86 M/ml mientras que en el grupo fumador dicha concentración fue de 43 M/ml. Cuando se agrupan a los individuos en 3 grupos (no fumador, fumador moderado y gran fumador)

también se observa dicha disminución estadísticamente significativa de la concentración (p-valor = 0,003). En el grupo no fumador la concentración media fue de 86 M/ml, en el grupo fumador moderado fue de 52 M/ml, y en el grupo gran fumador fue de 37 M/ml.

En ambos análisis se observa una disminución de la movilidad progresiva de los espermatozoides, pero en este caso no tenemos datos significativos que demuestren esta variación de forma estadística.

**CONCLUSIÓN**

Los varones no fumadores ven mejorada la calidad seminal en cuanto a la concentración espermática se refiere. Este es otro motivo para aconsejar a nuestros pacientes una vida sin tabaco.

## P-142: COMPARACIÓN DE ICSI CON FIV CONVENCIONAL EN CASOS DE FECUNDACIÓN MIXTA

F. Prados, G. Pérez-Bermejo, A. Díaz, O. Collado, M. Sánchez-Rivera e I. Bruna  
Unidad de Reproducción. Hospital de Madrid-Montepíncipe. Boadilla del Monte. Madrid.  
[fernandoprados@gmail.com](mailto:fernandoprados@gmail.com)

**INTRODUCCIÓN**

Las comparaciones rutinarias de los resultados obtenidos en casos de ICSI versus Fecundación in vitro convencional revelan diferencias que pueden ser debidas tanto a la técnica en sí como a la calidad de los gametos utilizados. Para conocer la influencia exclusiva de la técnica de fecundación en el resultado del tratamiento se debe eliminar el efecto debido a diferencias en los gametos. Con esta finalidad, se han analizado casos de fecundación mixta.

**OBJETIVOS**

Comparar la eficacia de la FIV convencional con la ICSI en los casos en que se hizo fecundación mixta.

**MATERIALES Y MÉTODOS**

Se analizan los resultados obtenidos en 202 ciclos de FIV realizados entre el año 2007 y el 31/01/2013. Estos ciclos correspondían a 194 parejas en las que la mujer era menor de 40 años y las muestras de semen presentaban un recuento espermático normal según los valores de la OMS. En todos los casos se repartieron los cúmulos al azar entre FIV convencional (FIV-C) e ICSI.

**RESULTADOS**

De los 1.426 cúmulos destinados a FIV-C se obtuvieron 764 cigotos. Mediante ICSI se obtuvieron 1.007 cigotos a partir de 1.618 cúmulos (p<0,01).

En día 3, los embriones de FIV-C tipo A (ASEBIR) fueron 13,1%; los B fueron 14,3%; los C 21,9% y los D 50,6%. Los de ICSI fueron 17,8% tipo A; 9,7% tipo B; 20,3% tipo C y 52,2% tipo D. Ninguna diferencia fue significativa. Tras selección morfológica en día 2-3, se transfirieron 109 embriones de FIV-C y 146 de ICSI. Se congelaron 283 embriones de FIV-C y 380 de ICSI. Hasta el 31/03/13 se descongelaron 171 embriones de FIV-C y 224 de ICSI. Analizando transferencias homólogas, la tasa de implantación en fresco fue de un 34,4% en FIV-C y 37,6% en ICSI. En descongelados, la tasa de implantación fue: 29,5% en FIV-C y 27,9% en ICSI. Sumando transferencias en fresco y descongelado, la tasa de aborto fue del 18,2% en FIV-C frente a un 21,0% en

ICSI, mientras que la tasa de gestación evolutiva fue de un 39,1% en FIV-C y de 35,5% en ICSI. En ningún caso las diferencias fueron significativas.

La tasa de fallo total de fecundación fue de un 10,4% en FIV-C y de un 1% en ICSI ( $p < 0,01$ ). En los 21 casos de fallo de fecundación en FIV-C se produjeron 16 gestaciones de ICSI de las que

resultaron 5 partos únicos, 5 dobles y una gestación en curso.

#### CONCLUSIONES

Nuestros datos indican que la tasa de fecundación es mayor en ICSI que en FIV-C. La calidad de los embriones procedentes de ambas técnicas fue muy similar tanto desde

el punto de vista morfológico como en capacidad de implantación. El riesgo de fallo total de fecundación es significativamente mayor con FIV-C. El presente estudio sugiere que, incluso en casos con una aceptable calidad espermática, realizar ICSI aumenta las probabilidades de fecundación de los oocitos sin un claro efecto negativo asociado.

## P-143: BENEFICIOS DE LA SELECCIÓN MAGNÉTICA DE ESPERMATOZOIDES (MACS) EN CICLOS CON FALLOS REPETIDOS Y EN CASOS CON FACTOR MASCULINO POR ELEVADA FRAGMENTACIÓN

M. Dorado; M. González; L. Aguilera; M. Hebles; A. Fernández; B. Migueles; M. Gallardo; N. Cruz; P. Sánchez; F. Sánchez  
Ginemed Clínicas, Sevilla  
[mdorado@ginemed.es](mailto:mdorado@ginemed.es)

#### INTRODUCCIÓN

La calidad de los gametos es fundamental para obtener un buen resultado tras el uso de las técnicas de reproducción asistida. Se ha observado, en pacientes que consultan por infertilidad, un mayor porcentaje de anomalías en su muestra de semen comparado con la población normal. Una de ellas es la translocación de fosfatidilserina, lo que evidencia eventos apoptóticos tempranos. La apoptosis es una de las causas más comunes que cursan con infertilidad en el varón. Si conseguimos seleccionar espermatozoides no apoptóticos lograremos mejores resultados en Técnicas de Reproducción Asistida. Esta separación la podemos realizar utilizando la separación Magnética de espermatozoides (MACS).

#### OBJETIVO

El objetivo de nuestro estudio es valorar la eficacia de esta técnica de selección de espermatozoides no apoptóticos. Ésta permite obtener una población de espermatozoides de mayor calidad para utilizarlos en TRA. Para ello comparamos la tasa de embarazo en pacientes sometidos a ciclos de Reproducción Asistida que tenían fallos

repetidos o factor masculino por alta fragmentación.

#### MATERIAL Y MÉTODO

Los pacientes que iban a ser sometidos a ICSI, tanto con óvulos propios como donados, se separaron en dos grupos. Se utilizó como grupo control ( $n=290$ ) pacientes a los cuales se les capacitó la muestra de semen por gradientes de densidad. El grupo estudio ( $n=175$ ) estaba compuesto por pacientes a los cuales su muestra de semen fueron capacitadas por gradiente de densidad y se utilizó además la filtración magnética (MACS) previa a la microinyección. A su vez, se separaron cada grupo en dos: grupo 1 donde se introdujeron aquellos que habían tenido al menos un fallo previo de ICSI y grupo 2 formado por pacientes con factor masculino (alta fragmentación)

#### RESULTADOS

En todos los casos en los que utilizamos las MACS previo a la microinyección espermática conseguimos aumentar la tasa de embarazo evolutivo con respecto al grupo control. De forma global pasamos de 49,3% a 58,9%, obteniéndose diferencias significativas

con una  $p=0.028$ , en fallos previos aumentamos de 43,5% a 50,7%, con una  $p=0.228$  y en factor masculino subimos de 52% a 63,9% con diferencias significativas y una  $p=0.03$ .

#### VCONCLUSIONES

La apoptosis es una de las causas por la cual el espermatozoide deja de ser viable. Gracias a la Separación Magnética de Espermatozoides podemos eliminar la población de espermatozoides dañados evitando así su utilización en Técnicas de Reproducción Asistida (TRA). Utilizando la muestra de espermatozoides seleccionados no apoptóticos hemos conseguido aumentar la tasa de embarazo evolutivo en nuestra población de pacientes sometidos a TRA, tanto en pacientes que ya tenían un ciclo previo fallido, como aquellos que entraban en ciclo por factor masculino.

## P-144: BAJA PERCEPCIÓN DEL RIESGO DE LOS EMBARAZOS MÚLTIPLES EN PAREJAS SOMETIDAS A FIV/ICSI EN UN HOSPITAL PÚBLICO ESPAÑOL

T. Jauregui Pérez, R. Mendoza, M. de la Sota, R. Matorras  
Hospital Universitario Cruces, Baracaldo, Bizkaia.  
[teresajauregui2@gmail.com](mailto:teresajauregui2@gmail.com)

### OBJETIVOS

Determinar la proporción de parejas que prefieren un embarazo múltiple frente a uno simple tras ciclo de FIVTE/ICSI.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio prospectivo llevado a cabo en un hospital público español. Se entregó una encuesta a rellenar por ambos miembros de la pareja justo antes de realizar la transferencia embrionaria en ciclo de FIV/ICSI y sin que supieran cuantos embriones se iban a transferir.

### RESULTADOS

La media de edad de las mujeres fue de 35.1±3.1 y la de los varones 38.1±4.0. El 86.3% de los pacientes no tenía ningún hijo previo y llevaban intentando descendencia 4.9 años. El 62.3% ya se habían sometido a un ciclo de FIV/ICSI con anterioridad. El 26.7% tenían nivel de estudios elemental, el 35.6% bachiller y el 37% nivel universitario. El 88% de ellos tenían profesiones no relacionadas con la

sanidad. El 66.4% de los encuestados preferían tener gemelos, frente al 28.1% que querían solo uno y al 5.5% que querían tener trillizos. El número de niños deseado era independiente del sexo de los encuestados, del nivel de estudios y de la profesión. Las que querían tener un solo hijo en ese ciclo aducían como primer motivo que ese era su "proyecto reproductivo" (34.1%), porque suponía un "menor riesgo para la madre" (29.3%), por "motivos económicos" (22%) y por "menor riesgo para el bebé" (11%). Como segundo motivo el predominante fue el económico (91.2%). Los motivos para querer gemelos fueron "evitar repetir ciclo de tratamiento" (58.6%), que les hacía "ilusión tener gemelos" (28.6%) y "evitar la lista de espera" (9%). Como segundo motivo "la ilusión de tener gemelos" (37.2%) y "evitar mas intentos" (34.8%) fueron los mas frecuentes seguidos de "evitar la lista de espera" (13.9%) y "porque tener gemelos no supone ninguna complicación médica" (13.9%). El 42.5% de los que tenían hijos previos también deseaban gemelos.

### CONCLUSIONES

El hecho de que el 71.9% de los pacientes deseen un embarazo múltiple, principalmente gemelos (66.4%) "porque les hace ilusión" y "porque así evitan tener que someterse a otro ciclo de FIV/ICSI y volver a la lista de espera" nos demuestra que desde un punto de vista psicológico estas parejas anteponen la ansiedad y el estrés a los riesgos que conllevan este tipo de embarazos. Parece por ello imprescindible la implantación de medidas destinadas a dotar a estas pacientes y a la población en general, de información clara y concisa relativa a los riesgos que presentan este tipo de embarazos con el objetivo de conseguir un cambio de actitud previo a cualquier ciclo de FIV/ICSI.

Por último, señalar la importancia del acompañamiento psicológico en estas parejas, no solo para prevenir esta actitud sino por la cantidad de beneficios que dicho apoyo conlleva (favorece la disminución del impacto emocional, ansiedad y depresión, logrando una mayor adherencia al tratamiento).

## P-145: IN VITRO EFFECT OF LEAD CHLORIDE ON SPERM PARAMETERS AND SPERM DNA DAMAGE

M.Gomes<sup>1</sup>; A. Gonçalves<sup>2</sup>; E. Rocha<sup>3</sup>; J. Silva<sup>2</sup>; A. Barros<sup>2,3</sup>; M. Sousa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dept. Microsc., Lab. Cell Biology, UMIB, Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar (ICBAS), University of Porto (UP), Porto, Portugal; <sup>2</sup> Centre Reprod. Genetics A. Barros, Porto, Portugal. <sup>3</sup> Dept. Microsc., Lab. Histology, ICBAS-UP, <sup>3</sup> Dept. Genetics, Faculty of Medicine, University of Porto; [msousa@icbas.up.pt](mailto:msousa@icbas.up.pt)

### INTRODUCTION

Occupational exposure to lead reduces sperm quality, by decreasing sperm

concentration, volume, morphology, motility and vitality, and it may interfere with the metabolism of zinc, essential for the function of several

enzymes, including those involved in the synthesis and repair of DNA. Lead compounds are also known to incite oxidative stress, which may lead to lipid

peroxidation of the sperm cells, rich in lipidic compounds.

#### OBJECTIVES

The aim of the study was to investigate the in-vitro influence of two concentrations of lead chloride ( $PbCl_2$ ), at two times of incubation, in sperm parameters (motility, vitality, hypoosmotic swelling test and morphology) and sperm DNA fragmentation.

#### MATERIALS AND METHODS

For this study 31 samples of semen were used. Seminal fluid was removed and the samples were diluted in sperm preparation medium to obtain a concentration per tube of 7,5 million/ml. The samples were incubated at room temperature, for 4h and 8h, with two concentrations of  $PbCl_2$  (15ppm and 30ppm). Samples were from patients who performed semen analysis and had normal concentration and motility. Semen values of each patient were used as controls (non-exposed). After incubation, samples were analyzed; a smear was prepared for morphology and another for analysis of DNA fragmentation by TUNEL (Terminal transferase-mediated

Deoxynucleotidyl dUDP Nick-End Labeling) assay.

#### RESULTS

Results showed that  $PbCl_2$  significantly inhibited rapid progressive motility ( $p < 0.001$ ), increased tail anomalies ( $p < 0.01$ ) in both times and concentrations, and decreased vitality ( $p < 0.05$ ) in the 30ppm group. DNA fragmentation was also significantly increased ( $p < 0.001$ ) in both times and concentrations.

#### DISCUSSION

Several studies have investigated the effect of lead on seminal parameters after in-vitro exposure. Our results are in accordance with others that have shown a decrease in sperm motility at 50ppm and 500ppm (1). Other authors also observed a decrease in sperm motility in a dose dependent manner, 51.5-5180 ms/l (2). Regarding DNA fragmentation, and in opposite to our results, no changes were observed after exposure to 3.5ppm and 5ppm during 24h (3).

The observed decrease in sperm motility and the increase in the number of tail anomalies suggests that lead

may have interfered with mitochondria and glycolysis (the principal pathway leading to energy production for sperm motility), as well as with membrane peroxidation through the generation of free oxygen radicals. The observed increase in DNA fragmentation can be explained by the binding of lead to human protamine-2 thus altering their binding to DNA. Furthermore, it may replace or compete with zinc present in this protein. Lead, which also causes oxidative stress, may induce lipid peroxidation and thereby reduce vitality and increase DNA fragmentation.

In conclusion, the present results showed that lead chloride significantly affects the majority of sperm parameters and increases DNA fragmentation, thus confirming previous studies and adding new information, which reinforces the urgent need to reduce lead exposure as much as possible.

#### REFERENCES

- (1) Huang et al (2001) *J Toxicol Environ Health, Part A*, 62(4):259-267;
- (2) Benoff et al (2003) *Hum Reprod*, 18(2):374-383;
- (3) López et al (2012) *CIENCIA*, 20(1):5-11.

## P-146: RESULTADOS DE CRIOTRANSFERENCIAS EN D3 VS D5 SEGÚN GRUPO DE EDADES

B. Amorocho, M. Mollá, D. Gumbao, A. Sánchez, J. Marcos, L. Fernández, M. Nicolás, J. Landeras  
IVI Murcia  
[beatriz.amorocho@ivi.es](mailto:beatriz.amorocho@ivi.es)

#### INTRODUCCIÓN

La vitrificación es una técnica que ha mejorado las tasas de supervivencia embrionaria/gestación/implantación en los últimos años en pacientes que mantienen embriones supernumerarios.

Las criotransferencias embrionarias en D3 se realizan en la mayoría de los casos por tener pocos embriones disponibles, mientras que las criotransferencias

en D5 se deben a una mejor selección embrionaria, reduciendo el número de embriones a transferir, evitando el embarazo múltiple y

permitiendo una mejor sincronización entre el embrión y el endometrio.

#### OBJETIVO

Analizar los resultados en tasas de gestación/implantación en

criotransferencias embrionarias de D3 y D5 en pacientes de ovocitos propios, en tres grupos de edad.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo realizado en el IVI-Murcia, desde Mayo 2012 hasta Abril 2013. Un total de 268 criotransferencias fueron incluidas en este estudio, que fueron clasificadas según día de desarrollo embrionario (D3 ó D5) y edad.



Criotransfer en D3(104) y en D5(65) en pacientes menores de 38 años.

Criotransfer en D3(27) y en D5(23) en pacientes con 38 y 39 años.

Criotransfer en D3(21) y en D5(28) en pacientes mayores de 39 años.

La media de embriones transferidos fue entre 1,3 y 1,6.

El sistema de vitrificación utilizado fue el Cryotop y los medios pertenecen a la casa Life Global.

El análisis estadístico se realizó con el test de Fisher con valor significativo cuando  $p < 0.05$ .

### CONCLUSIONES

Con estos resultados encontramos una tendencia, aunque no significativa en

### RESULTADOS POR GRUPOS DE D3 VS D5 DE LA CRIOTRANSFERENCIA Y EDAD

D3 vs D5	<38 años D3	<38 años D5	38&39 años D3	38&39 años D5	> 39 años D3	> 39 años D5
Ciclos	104	65	27	23	21	28
Media embriones	1,6	1,6	1,4	1,3	1,3	1,4
T. Gestación	31,7% (33)	46,2% (30)	25,9% (7)	26,1% (6)	19,1% (4)	39,3% (11)
T. Implantación	27,1%	36,3%	20,5%	24,2%	14,3%	33,3%
T. Aborto	12,1% (4)	13,3% (4)	28,5% (2)	33,3% (2)	0% (0)	36,4% (4)

tasas de gestación/ implantación en el grupo de criotransferencias D5 en pacientes menores de 38 años.

También se puede observar que se está evitando el embarazo múltiple debido a que en la mayoría de los casos se hace transferencia de un solo embrión.

## P-147: ESTUDIO COMPARATIVO MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO DE DOS MEDIOS DE CAPACITACIÓN DE SEMEN POR GRADIENTES DE DENSIDAD: PURESPerm® (NIDACON) VS ISOLATE® (IRVINESCIENIFIC)

G. López Granollers<sup>2</sup>; M. Fors<sup>1</sup>; J. Pérez<sup>1</sup>; G. López<sup>2</sup>; A. Nicolich<sup>3</sup>; R. Lafuente<sup>2</sup>; M.A. Checa<sup>4</sup>; R. Carreras<sup>4</sup>; M. Brassesco<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Máster Medicina Reproductiva. Parc Salut Mar. UAB. Barcelona. <sup>2</sup> Laboratorio de Andrología. CIRH. Clínica Corachan. ANACER. Barcelona.

<sup>3</sup> Departamento de Biología Celular. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona, Barcelona. <sup>4</sup> Departamento de Obstetricia y

Ginecología. Parc de Salut Mar. Barcelona

[glopez@cirh.es](mailto:glopez@cirh.es)

### INTRODUCCIÓN

En técnicas de Reproducción Asistida es de elevada importancia proceder a la rápida separación de los espermatozoides del plasma seminal, ya que una prolongada exposición al mismo puede suponer una disminución de su funcionalidad. Recientes evidencias han demostrado que la separación de espermatozoides mediante gradientes de densidad no sólo induce su capacitación, sino que también presentan menos daños en el DNA y por tanto contribuye a una mejora de la calidad embrionaria. De

esta manera los gradientes de densidad se realizan de forma rutinaria en los centro de Reproducción Asistida.

### OBJETIVOS

Este estudio pretende comparar dos medios de capacitación comerciales y comprobar con cuál se obtienen mejores resultados en los parámetros seminales post-capacitación.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Los medios de capacitación utilizados son: el PureSperm fabricado por

Nidacon International AB, el cual utiliza gradientes al 40% y al 80%, y el ISolate® fabricado por IrvineScientific con gradientes al 50% y al 90%.

En estudio preliminar se han incluido 9 pacientes a los cuales se les realiza un seminograma rutinario antes de la capacitación.

La muestra se divide en 2 fracciones, una es capacitada mediante el protocolo de PureSperm y la otra con ISolate®

Se procede con los lavados con ambos gradientes de densidad y se vuelve a

realizar un seminograma para comparar los resultados de concentración y movilidad progresiva entre el pre y post capacitado y también entre los dos capacitados.

Utilizando citometría de flujo (MACSQuantAnalyzer, Miltenyi Biotec) se realiza el test de fragmentación del ADN mediante SCSA. Se determina el porcentaje de espermatozoides apoptóticos (anexinas V-FITC) y el porcentaje de vitalidad (yoduro de propidio). Se analizan todas las fracciones de cada muestra.

Se comparan los resultados obtenidos con el programa estadístico SPSS con la prueba T-Test para muestras apareadas.

#### RESULTADOS

Tanto en la concentración como en el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos no observamos diferencias significativas entre los dos medios ( $p=0,536$  y  $p=0,862$ ).

El porcentaje de espermatozoides fragmentados observados en la muestra en fresco disminuye significativamente capacitando con el medio ISolate® ( $p=0,001$ ) aunque comparando los dos capacitados no vemos diferencias significativas utilizando un medio u otro ( $p=0,307$ ).

La cantidad de apoptóticos totales disminuye aunque no significativamente respecto la muestra en fresco pero si es significativa la disminución del porcentaje de apoptóticos vivos. Esto sucede en ambas técnicas ( $p=0,013$  y  $p=0,016$ ), pero no observamos diferencias si comparamos las dos post-capitados entre sí ( $p=0,796$ ).

El porcentaje de espermatozoides vivos tampoco varia significativamente comparando ambos medios.

#### CONCLUSIONES

Esperamos aumentar el número de casos para darle al estudio más significación

estadística pero según los resultados obtenidos podemos afirmar que ambas técnicas de capacitación son válidas para su uso en TRA. Hemos observado que las dos mejoran los parámetros seminales estudiados.

Podríamos pensar que ISolate® mejora el porcentaje de fragmentación respecto a la muestra en fresco ya que lo disminuye significativamente, pero comparado con el capacitado de PureSperm no observamos diferencias, por tanto concluimos que ambos medios serian igual de válidos.

Ambos medios son capaces de disminuir el porcentaje de apoptóticos, incluso las células apoptóticas que aún están vivas. Ésta disminución observada en el porcentaje de apoptóticos vivos podría explicarse si consideramos que estas células van perdiendo su movilidad y funcionalidad, aunque estén vivas. Así, éstas quedan retenidas en la interfase en el momento de su capacitación y su recuperación es menor.

## P-148: VALOR DE LA AMH COMO MARCADOR PREDICTIVO DE LOS RESULTADOS DEL CICLO DE FIV: NUESTRA EXPERIENCIA

A. Fabregat, J.A. Ortiz, B. Lledó, R. Morales, J. Ten, J. Llácer, R. Bernabeu  
 Instituto Bernabeu Biotech, Alicante.  
[afabregat@institutobernabeu.com](mailto:afabregat@institutobernabeu.com)

#### INTRODUCCIÓN

La hormona antimülleriana (AMH) es una glicoproteína producida en el ovario únicamente por las células de la granulosa de los folículos preantrales y antrales de pequeño tamaño siendo secretada a la circulación sanguínea. Es por este motivo por lo que los niveles de AMH en suero reflejan la reserva ovárica.

Las concentraciones de AMH podrían predecir de forma positiva los resultados en los tratamientos de FIV, pero esta relación no ha sido confirmada por todos los autores.

#### OBJETIVOS

El objetivo de este estudio es evaluar la asociación entre los niveles de AMH en suero y la reserva ovárica, así como también su relación con resultados óptimos en tratamientos FIV.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio retrospectivo en el cual se determinaron los niveles de AMH en suero de mujeres que acudieron a nuestro centro por motivo de esterilidad/infertilidad durante el periodo Diciembre 2010-Diciembre 2011. Hemos analizado dos grupos de pacientes: un total de 108

pacientes que realizaron tratamiento en nuestro centro ( $n=158$  ciclos) y otro grupo de mujeres que mostraron valores indetectables de AMH ( $n=60$ ) ya que se trata de un grupo de especial interés por su mal pronóstico reproductivo. Se determinaron los niveles de AMH en suero y el recuento de folículos antrales (AFC) y se analizaron los resultados del ciclo de FIV empleando como principales parámetros el el número de ovocitos recogidos tras la estimulación ovárica, la calidad embrionaria el día de la transferencia y la tasa de embarazo.

Para la determinación de los niveles de AMH en suero se utilizó un método

ELISA (AMH Gen II; Diagnostic Systems Laboratories-Beckman Coulter Inc). El análisis estadístico fue llevado a cabo usando el programa SPSS y un test de regresión lineal o logística según el tipo de variable analizado. La edad de la mujer y el factor masculino fueron introducidos en el análisis como factor de confusión.

## RESULTADOS

En el primer grupo de pacientes (n=108) se encontró una correlación significativa entre los niveles de AMH en suero y el recuento de folículos antrales, la dosis total administrada de FSH, los días de estimulación ovárica, el número de ovocitos maduros recuperados y el

número de embriones evolutivos, sin embargo no se encontró correlación significativa con la calidad embrionaria (embriones tipo A+B) ( $p=0.987$ ) ni con BHCG ( $\beta$ -gonadotropina coriónica humana) positiva ( $p=0.103$ ).

Además los niveles de AMH en suero demostraron ser un factor predictivo ( $R=63.4\%$ ) en relación con el recuento de folículos antrales pero no con el resto de parámetros considerados.

Del grupo de pacientes con valores indetectables de AMH (n=60), 10 (16.7%) optaron por tratamientos de ovodonación y 14 de ellas (23.3%) iniciaron ciclos de FIV/ICSI con ovocitos propios. De ellas, el 50 % fueron

canceladas por falta de respuesta ovárica. De los 7 ciclos restantes se obtuvieron dos betas positivas (28.6%) una de ellas resultando en aborto bioquímico y la otra en aborto clínico.

## CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, los niveles de AMH en suero pueden ser considerados como marcador de reserva y de respuesta ovárica ante estimulaciones controladas pero no como factor predictivo de embarazo tras un ciclo de reproducción asistida. Sin embargo, en nuestra experiencia cuando dichos valores son indetectables las probabilidades de conseguir un embarazo evolutivo son prácticamente nulas.

## P-149: PAPEL DEL CARIOTIPO EN EL ESTUDIO GENÉTICO DEL HOMBRE ESTÉRIL: ESTUDIO MULTICÉNTRICO ANACER

F. Marina<sup>1,2</sup>, F. García<sup>1,3</sup>, R de La Fuente<sup>1,4</sup>, C. Ochoa<sup>1,5</sup>, F. Graña<sup>1,5</sup>, M. Ruiz<sup>1,6</sup>, J.M. Moreno<sup>1,7</sup>, J. Rueda<sup>1,8</sup>, G. Manzanera<sup>1,9</sup>

<sup>1</sup> Asociación Nacional de Clínicas de Reproducción Asistida (ANACER), <sup>2</sup> Instituto de Reproducción CEFER. Barcelona, <sup>3</sup> Instituto Marqués, <sup>4</sup> CIRH. Barcelona, <sup>5</sup> CEFIVA. Asturias, <sup>6</sup> CREA. Valencia, <sup>7</sup> Unidad de Reproducción Clínica Vistahermosa. Alicante, <sup>8</sup> Unidad de Genética Clínica Vistahermosa. Universidad Miguel Hernández. Alicante, <sup>9</sup> Centro Ginecológico Manzanera. Logroño  
[fernando@institutocefer.com](mailto:fernando@institutocefer.com)

## INTRODUCCIÓN

Es conocido que la incidencia de alteraciones en el cariotipo del hombre estéril es de 8 a 10 veces superior que en la población fértil. Sin embargo, no todas las clínicas estudian rutinariamente el cariotipo en el varón. Las consecuencias que una alteración cromosómica puede tener sobre el éxito o fracaso de una técnica de reproducción asistida hace que cada vez sea más importante informar a los pacientes sobre este riesgo genético. Desde las clínicas ANACER defendemos una medicina de calidad encaminada a evitar riesgos a los pacientes y defendemos la utilidad del estudio del cariotipo en el hombre.

## OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es analizar la mayor serie jamás publicada en España

y en el Mundo de cariotipos efectuados en pacientes que acuden a una clínica de reproducción.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha estudiado una población de pacientes varones que acuden a un centro de reproducción asistida independientemente de la calidad seminal. Se han analizado un total de 11.676 cariotipos en sangre periférica mediante técnica de bandas G.

## RESULTADOS

La incidencia de cariotipos alterados ha sido del 2,3% (271/11.676). Se han detectado 33 casos de síndrome de Klinefelter (12,2%); 8 casos de síndrome de Klinefelter mosaicos (2,9%); 9 casos de cariotipo 47, XYY (3,3%); 44 casos de translocaciones Robertsonianas (16,2%); 56 casos de

translocaciones recíprocas (20,7%); 62 casos de inversiones (22,8%); y 59 casos de otras anomalías (cromosomas marcadores, mosaicos, etc..) (21,8%).

## CONCLUSIONES

La incidencia publicada de alteraciones cromosómicas en niños varones recién nacidos es del 0,38% (366/94.465). Nuestros datos muestran una incidencia 6 veces mayor en la población masculina adulta que acude a un centro de reproducción. Es conocido que esta incidencia aumenta conforme disminuye la calidad seminal. Independientemente de los parámetros seminales, consideramos que el mayor riesgo de ser portador de una alteración cromosómica hace aconsejable este estudio en todo varón que se vaya a someter a un tratamiento de fertilidad.

## P-150: UNA NUEVA TÉCNICA UNIVERSAL DE ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS, EN VIVO Y SIN TINCIÓN

A. García, J. Contell, M.C. Fuentes, M. Sancho, A. Mata, L. Bassas, J. Bataller, M. Ruíz, T.G. Cooper, C. Soler  
 Departament de Biologia Funcional i Antropologia Física, Facultat de Biologia, Universitat de València/PROISER R+D, S.L. Burjassot, València  
[almudena.garcia@proiser.com](mailto:almudena.garcia@proiser.com)

### INTRODUCCIÓN

El estudio de la morfología espermática tiene una considerable relevancia en la valoración de la fertilidad de una muestra. No obstante, la gran variedad de técnicas de fijación/tinción y los diversos criterios de clasificación que de ellas se derivan hacen casi imposible un acuerdo universal en la evaluación morfológica del semen humano. Como consecuencia, las técnicas convencionales introducen una considerable variabilidad en el diagnóstico, además de crear alteraciones en las células. Algunas de estas alteraciones están relacionadas con el secado al aire de la extensión de semen, como cambios en la morfología celular (reduciendo, por ejemplo, el tamaño de las cabezas espermáticas), expansión de cabezas de espermatozoides inmaduros, y pérdida de las gotas citoplasmáticas por ósmosis. La posterior tinción con una gran diversidad de técnicas introduce nuevos artefactos en la valoración final de las muestras, no siendo extrapolables los resultados obtenidos con una técnica a los obtenidos con otra.

### OBJETIVOS

Se pretende desarrollar una protocolo de uso universal, basada en una nueva patente, y que permite la observación de todos los componentes espermáticos, en células vivas, inmovilizadas por golpe de calor y sin necesidad de tinción.

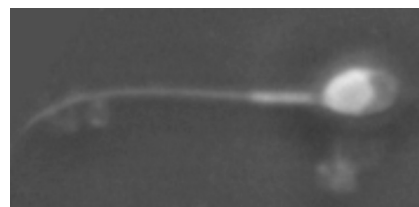
### MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron 15 muestras de semen, procedentes de donantes y pacientes, con el fin de disponer de una multiplicidad de casos clínicos, que se obtuvieron por masturbación, con una abstinencia eyaculatoria

entre 2 y 4 días. Tras la licuefacción, se procedió a depositar 3µl de muestra en un porta, previamente desengrasado, colocando un cubre de 24x24mm. Dicha preparación se sometió a una presión constante de forma simultánea a un golpe de calor de 60°C durante 5s. A continuación, se procedió a la observación con un microscopio de contraste de fase negativo a 60x, capturándose las imágenes con la ayuda de una sistema CASA ISAS®v1, que incluía una cámara Proiser R+D728M (Proiser, Paterna, Valencia, España) acoplada a un microscopio UOP-UB203 (Chongqing, China).

### RESULTADOS

Las imágenes obtenidas permiten observar con extrema definición los diferentes componentes espermáticos: Cabeza, Pieza Intermedia y Cola. Dentro de la cabeza se observa bien contrastado el acrosoma, pudiéndose observar la presencia de vacuolizaciones tanto en el mismo, como en la zona post-acrosómica. Además, algunas células presentan un bajo contraste (traducido en una baja intensidad de brillo), indicando una diferente densidad intracelular. En la pieza intermedia se puede apreciar fácilmente la presencia de gotas citoplásmicas (proximales, medias o distales), así como de restos citoplásmicos. Cabe señalar que la pieza intermedia queda muy bien definida, si bien en algunas células se presentaba continuidad con la cola, que se puede apreciar hasta su extremo.



*Ejemplo de visión de una célula de morfología normal*

### CONCLUSIONES

La nueva técnica de análisis morfológico espermático es la primera que se hace en células vivas, siendo sencilla y rápida ya que no requiere de ningún medio de fijación ni tinción. Las imágenes obtenidas son nítidas y de gran resolución, pudiéndose diferenciar todos los componentes espermáticos. Además es fácilmente reproducible, lo que permitirá llegar a un acuerdo universal.

## P-151: ESTUDIO SOBRE LA VARIABILIDAD DE LA CALIDAD SEMINAL EN VARONES VOLUNTARIOS: UN ESTUDIO DE SEGUIMIENTO

C. Pérez Palazón <sup>1,2</sup>; J.J. López Espín <sup>3</sup>; J. Mendiola Olivares <sup>2</sup>; A. Cutillas Tolín <sup>2</sup>; L. Mínguez Alarcón <sup>2</sup>; J.D. Román Arias <sup>1</sup>; A.M. Torres Cantero <sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Centro Ginecológico de Reproducción y Genética, Murcia. <sup>2</sup>División de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia, Murcia. <sup>3</sup>Centro de Investigación Operativa. Universidad Miguel Hernández, Elche (Alicante).  
[mreproductivac@gmail.com](mailto:mreproductivac@gmail.com)

### INTRODUCCIÓN

La variabilidad de la calidad seminal, principalmente concentración espermática, es un aspecto conocido en humanos. Estos cambios pueden estar condicionados por múltiples determinantes que, hasta donde conocemos, no han sido completamente elucidados. De hecho, muy pocos trabajos han llevado a cabo un estudio exhaustivo de los posibles factores que pudieran influir en la variabilidad mencionada anteriormente.

### OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es explorar la variabilidad de los parámetros seminales en una cohorte de varones voluntarios.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio de seguimiento realizado en 19 varones voluntarios de Murcia durante 16 meses (febrero 2012 - mayo 2013). Los participantes proporcionaron muestras seminales periódicas y cumplieron cuestionarios epidemiológicos cada vez

que acudían a las sesiones clínicas. También se obtuvieron muestras sanguíneas y se realizó un examen andrológico completo, incluyendo medidas de distancia anogenital. Los análisis de parámetros seminales (concentración, movilidad y morfología espermática) se realizaron siguiendo las recomendaciones de la OMS (2010). Se obtuvieron estadísticos descriptivos de los principales parámetros seminales y otras variables importantes relacionadas. La variabilidad de los parámetros seminales se estudiaron mediante modelos lineales generales de medidas repetidas. El nivel de significación estadística se fijó en 0.05 y el paquete estadístico utilizado fue el SPSS 19.0©.

### RESULTADOS

La edad media y desviación estándar (DE) de los sujetos fue de 31.5±6.2 años y la mitad presentaban hábito tabáquico. Los resultados preliminares muestran que un porcentaje amplio de los individuos presentaban variaciones significativas en sus parámetros seminales, principalmente relacionados con la concentración

y movilidad espermática (p valor >0.05). Sin embargo, esa variabilidad fue mucho menor con respecto a la morfología espermática (p valor <0.05). En un siguiente paso se analizarán los determinantes que pudieran estar relacionados con esta variabilidad seminal, como por ejemplo, las características de la muestra (e.g. tiempo de abstinencia, tiempo desde la obtención hasta el análisis, estación del año), examen físico (índice de masa corporal, distancia anogenital, alteraciones testiculares) o hábitos de vida (ingesta de alcohol, tabaco, estrés, ejercicio físico, etc.).

### CONCLUSIONES

Nuestros resultados son concordantes con trabajos previos que muestran una variabilidad intraindividual en la concentración y movilidad espermática a través del tiempo. Estas fluctuaciones no son tan evidentes con respecto a la morfología espermática. En un siguiente paso se analizarán los factores y determinantes que podrían asociarse con la presencia o no de variabilidad en los distintos parámetros seminales del varón.

## P-152: VALORACIÓN DE LÁSER ASSISTED HATCHING (LAH) EN CRIOTRANSFERENCIAS SEGÚN EL TAMAÑO DE LA ZONA PELÚCIDA: DATOS PRELIMINARES DE UN ESTUDIO RANDOMIZADO

B. Amorocho, G. Calderón, M. Mollá, D. Gumbao, A. Sánchez, J. Marcos, L. Fernández, M. Nicolás, J. Landeras  
 IVI Murcia, Murcia  
[beatriz.amorocho@ivi.es](mailto:beatriz.amorocho@ivi.es)

### INTRODUCCIÓN

Existe la hipótesis del endurecimiento de la zona pelúcida en los embriones

congelados, que puede interferir en el correcto proceso de hatching espontáneo. Los estudios de Balaban et al., en 2006 y Gabrielsen et al., en el

2004 revelan que la realización de AH (assisted hatching) mejora las tasas de gestación en transferencias de embriones descongelados, mientras que



los trabajos publicados por Hung Yu et al. en el 2005 no encuentran beneficio en dicho procedimiento.

Un estudio de Hiraoka et al., en 2009, demuestra el aumento de tasas de gestación e implantación en criotransferencias aplicando afinamiento de la zona pelúcida mediante LAH en dos áreas diferentes de la zona pelúcida del embrión, reportando mejores resultados de tasas gestación/implantación cuando se realiza el afinamiento de la mitad del área embrionaria.

Ninguna de las publicaciones estudia edad de las pacientes.

## OBJETIVO

Analizar en criotransferencias, los embriones vitrificados-desvitrificados transferidos en D3 de desarrollo, si se benefician del afinamiento de la zona pelúcida mediante LAH en 1/4 ó 1/2, dependiendo de la edad de la paciente con ovocitos propios.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio prospectivo y randomizado, realizado en el IVI-Murcia, en 2012. Se

## Resultados por grupos de pacientes según edad y afinamiento de la zona pelúcida

	< 38 años 1/4LAH	< 38 años 1/2 LAH	≥ 38 años 1/4LAH	≥ 38 años 1/2 LAH
Ciclos	45	41	17	21
Tasa Gestación	35,6 %	31,7%	35,3%	28,6%
Tasa Implantación	30,6%	28,0%	25,0%	22,3%

estudiaron 124 criotransferencias. Se realizó afinamiento en un cuarto de la zona pelúcida (1/4LAH) a embriones de 62 ciclos y 62 ciclos en la mitad de la zona pelúcida embrionaria (1/2LAH). Dentro de estos dos grupos, se subdividió la población en dos grupos de edades: Menores de 38años y Mayor o igual a 38 años.

Para realizar el LAH se usó el sistema Octax laser shot.

Las pacientes de DGP fueron excluidas en este estudio. El medio de cultivo utilizado fue Global, el medio de vitrificación de Kitazato y el método de cryotop.

El análisis estadístico se realizó con el test de Fisher con valor significativo cuando  $p < 0.05$ .

La media de embriones transferidos fue de 1,5 en ambos grupos.

## CONCLUSIONES

A pesar de no encontrarse diferencias estadísticamente significativas en el afinamiento de las zonas pelúcidas embrionarias con LAH, hay una tendencia favorable al 1/4 LAH en tasas de gestación/implantación. Se necesitan más casos para que el estudio tenga resultados concluyentes.

## P-153: NIVELES DE PLAGUICIDAS EN LÍQUIDO FOLICULAR DE PACIENTES QUE VAN A SER SOMETIDAS A FIV EN EL HOSPITAL TORRECARDENAS: TASAS DE EMBARAZO Y RESULTADOS PERINATALES

MA. Vilches Ferrón, M. Trabalón Pastor, E. Sánchez Fornieles, T. Parrón Carreño, G. Fiol Ruiz.  
Complejo Hospitalario Torrecardenas-Almería  
[mangel.vilches.sspa@juntadeandalucia.es](mailto:mangel.vilches.sspa@juntadeandalucia.es)

## INTRODUCCIÓN

Muchos productos usados como plaguicidas tienen un efecto "disruptor" sobre la actividad endocrina. Xenobióticos estructuralmente similares a hormonas pueden actuar como agonistas o antagonistas de los receptores de hormonas endógenas. En el embarazo, cuando la demanda nutricional aumenta, los depósitos

de grasa se movilizan y las moléculas acumuladas en este tejido, incluyendo aquéllas con actividad disruptora endocrina, se vierten al torrente sanguíneo desde donde difunden a los tejidos diana. Estos productos químicos se cree que adversamente afectan a la función reproductiva de los seres humanos, sin embargo, no hay estudios que han explorado la asociación entre la fertilización y la

exposición a estos contaminantes ambientales.

## OBJETIVOS

Valorar los niveles de plaguicidas en líquido folicular, en aquellas pacientes con exposición crónica tipo ocupacional a los mismos y no expuestas que van a ser sometidas a FIV, y su relación con tasas de

embarazo y resultados perinatales frente a las no expuestas.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Es un estudio de cohortes, una de las cuales está expuesta al pesticida (cohorte expuesta) y la otra no (cohorte no expuesta). Los individuos que componen los grupos de estudio se seleccionan en función de que estén expuestos al pesticida o no. Asumiendo que la proporción en el grupo control es del 35%, la proporción en el grupo de mujeres expuestas es del 14% (Jurgen et al., 2006), y que la proporción de sujetos en el grupo control respecto al total es del 50% será necesario incluir 65 mujeres en el grupo de los expuestos y 65 en el grupo de no expuestas, totalizando 130 sujetos en el estudio.

Teniendo en cuenta que el porcentaje esperado de abandonos es del 10% fue necesario reclutar 73 mujeres en cada grupo, totalizando 146 sujetos en el estudio, durante el periodo de Enero de 2012 a Septiembre de 2013.

#### RESULTADOS

Hasta Mayo de 2013 el número de pacientes incluidas en el estudio ha sido de 75. La media de edad fue de 34,3 años, de ese total la cohorte expuesta es de 20 mujeres (26,7%) y la cohorte no expuesta de 53 mujeres (73,3%). De la cohorte expuesta se embarazaron el 10% y de la cohorte no expuesta se embarazaron el 9,4%. Del total de mujeres expuestas el 41% tras PF, se obtuvieron ovocitos con calidad adecuada para ser inseminados (MII

para ICSI), de las no expuestas el 32%. Los embarazos en la cohorte expuesta fueron generados por preembriones de calidad A (67%) y D (33%). Del total de gestantes (expuestas y no expuestas) solo ha llegado a término uno, presentó alguna complicación obstétrica, siendo la más prevalente los trastornos hipertensivos del embarazo.

#### CONCLUSIONES

Los resultados del estudio apuntan (hasta el momento) hacia un incremento de la prevalencia de complicaciones obstétricas en las gestantes con FIV-ICSI en nuestro medio, pero sin obtener una correlación significativa con la presencia o no de pesticidas en el líquido folicular.

## P-154: DEFINICIÓN DE LAS CONDICIONES DE ANÁLISIS DE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA DEL ZORRO (*ALOPEX LAGOPUS*) MEDIANTE EL SISTEMA CASA ISAS®V1

A. García, J. Contell, M.C. Fuentes, M. Sancho, C. Soler

Departament de Biologia Funcional i Antropologia Física, Facultat de Biologia, Universitat de València/PROISER R+D, S.L. Burjassot, València [almudena.garcia@proiser.com](mailto:almudena.garcia@proiser.com)

#### INTRODUCCIÓN

El zorro domesticado constituye una fuente de ingresos muy importante en países como Finlandia, donde la cabaña supera los 2 millones de ejemplares. Pese a su gran importancia económica, y a que la reproducción es, casi exclusivamente, por inseminación artificial, el conocimiento sobre sus características seminales es muy escaso.

#### OBJETIVOS

Se pretende hacer un estudio pormenorizado de las condiciones de análisis de movilidad del semen de zorro, mediante análisis computacional. Además, se definirá las características de la movilidad espermática, mediante análisis multivariante en dicha especie.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

La extracción de muestras y análisis se llevó a cabo en diferentes granjas, situadas en la región de Vaasa (Finlandia), entre los días 11 y 14 de Marzo de 2013, a mediados de la temporada de cría, que suele comprender de Febrero a Mayo. Se obtuvieron, por masturbación, muestras de 5 machos de zorro azul (*Alopex lagopus*), que se analizaron transcurridos 30 min desde la extracción, para permitir la licuefacción. Las muestras se diluyeron con medio comercial (Kubus, Las Rozas, España), según la concentración del eyaculado, hasta conseguir una concentración final del orden de 50-300 células por pantalla. Para el análisis de motilidad y concentración se utilizaron cámaras de recuento desechables ISAS® D4C20 (Proiser R+D, Paterna, España).

Cada cámara comprende 4 carreras de 7 campos cada una, distribuyéndose la muestra a lo largo de cada carrera por capilaridad. Los análisis de movilidad y cinética se hicieron con el software ISAS®v1 (Proiser R+D), equipado con una cámara de vídeo Proiser 782M (Proiser R+D), acoplada a un microscopio UOP-UB203 (Chongqing, China). Las capturas se tomaron a 10X con objetivo de contraste de fase negativo. La platina del microscopio mantenía una temperatura constante de 36°C. Se capturaron 7 campos/análisis, siendo el campo 1 el más cercano al lugar de carga de la cámara.

A partir del conjunto de los espermatozoides, se definió las características cinéticas del semen de zorro azul. Por otra parte, se calculó el número mínimo de células que es

representativo del total por muestra, así como las diferencias entre los distintos campos de la cámara de recuento. Finalmente, se analizaron las diferencias entre animales, así como la presencia de subpoblaciones celulares en el eyaculado.

### RESULTADOS

A partir del conjunto de los espermatozoides analizados en los cinco animales (7039), se definió las características cinéticas del semen de zorro azul, con los siguientes valores medios: VCL  $107,33 \pm 47,68$ ; VSL  $43,19 \pm 29,40$ ; VAP  $61,12 \pm 31,12$ ;

LIN  $38,72 \pm 18,24$ ; ALH  $4,41 \pm 1,80$ ; BCF  $8,86 \pm 4,03$ . Tras hacer agrupaciones decrecientes desde 800 células por muestra hasta 50, el análisis estadístico mostró que los resultados obtenidos con 50 células se pueden considerar suficientes. En cuanto a los campos, se vio diferencias en los últimos campos (6-7), si bien estas diferencias no fueron uniformes entre animales, por lo que su análisis puede servir para valorar características individuales con un posible significado biológico. Como sucede en otras especies, tanto los valores cinéticos como la distribución de subpoblaciones fue diferente

entre animales, mostrando diversas estrategias reproductivas que deben tenerse en cuenta a la hora de considerar un manejo reproductivo individualizado.

### CONCLUSIONES

En la valoración de fertilidad y el cálculo de elaboración dosis seminales para inseminación artificial, se recomienda analizar los cinco primeros campos de las cámaras de recuento, con, al menos 50 células. Las diferencias observadas entre animales recomiendan profundizar en un tratamiento individualizado de las muestras.

## P-155: OPTIMIZACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS ENDOMETRIALES DE ÚTEROS OVINOS PARA SU UTILIZACIÓN EN TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

J. Mijares, N. Hernández, C. Tobajas, E. Matilla, L. Correa, D. Celdrán, V. Casas, J. Casado, IS. Álvarez, FM. Sánchez-Margallo  
Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón. Cáceres  
[jmijares@ccmijesususon.com](mailto:jmijares@ccmijesususon.com)

### INTRODUCCIÓN

La disponibilidad de los laboratorios a la hora de obtener material biológico de origen animal para realizar estudios en técnicas de reproducción asistida es limitada. Los cultivos de células del endometrio son necesarios para gran cantidad de estudios tales como los co-cultivos embrionarios, análisis de la expresión génica, endometriosis, etc. Para la obtención de este material, la mayoría de las veces es cedido por mataderos, sin saber en qué condiciones se extrae. En este estudio pretendemos dilucidar los tiempos máximos que deben transcurrir a la hora de realizar la extracción de células endometriales, su separación y su purificación de cara a su utilización en las técnicas de reproducción asistida.

### OBJETIVO

Establecer los límites temporales en los que se puede obtener células endometriales de un útero ovino.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio se obtuvieron 7 úteros en condiciones estériles de ovejas procedentes de un curso de toracoscopia, sacrificadas a la misma hora que fueron introducidos Suero Fisiológico con Penicilina/Streptomycin (37°C). Se establece como grupo control (K0) el útero del animal extraído tras el sacrificio. Los posteriores úteros se extrajeron en intervalos de 1 hora, manteniendo un útero en un recipiente (F) y otro dentro de la oveja hasta el comienzo de su procesamiento (D). De tal forma que quedarían los grupos como K1, F1 y D1, F2 y D2, F3 y D3. En los rumiantes, el tejido endometrial está formado por carúnculas, que son lugares de implantación y placentación, y áreas intercarunculares que contienen un gran número de glándulas relacionadas en el establecimiento y mantenimiento del embarazo. Bajo campana se se procede al raspado de las carúnculas y al material obtenido se le añade colagenasa [0,1%], previamente

activada. Las células obtenidas se incuban a 37°C en medio DMEM con agitación durante 1,5-2 horas. Después de centrifugar, filtrar y resuspender, se añade 1ml de ACK y se produce la siembra en Flask de 75. La incubación y crecimiento se produce a 37°C + 5% CO<sub>2</sub> durante 42 horas con dos cambios de medio. Finalizado el cultivo, se realiza el conteo mediante tinción con azul tripan y la utilización de un contador de células automatizado (BD Counter Cell).

### RESULTADOS

Las poblaciones celulares obtenidas en el grupo control y a tiempo 0 sería de K0 =  $29 \times 10^6$ /ml, mientras que según transcurrió el tiempo y se mantuvo dentro o fuera de la oveja el útero sería F1 =  $26,8 \times 10^6$ /ml, D1 =  $7 \times 10^4$ /ml, F2 =  $5,4 \times 10^6$ /ml, D2 = contaminación masiva, F3 =  $8,1 \times 10^6$ /ml, D3 =  $5 \times 10^4$ /ml.

### CONCLUSIONES

Para la obtención de poblaciones de células endometriales de ganado ovino

en condiciones óptimas para su uso en el laboratorio no debería transcurrir más de una hora desde el sacrificio del

animal y el útero debería ser extraído del animal. Tiempos más largos o el mantenimiento del útero en el animal

producen resultados muy pobres y contaminación posiblemente debido a la flora bacteriana del animal.

## P-156: EVALUACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ESTUDIOS SOBRE CALIDAD SEMINAL: EXPOSICIÓN AMBIENTAL VS EXPOSICIÓN OCUPACIONAL

A. Clavero; M. Serrano; MC. Gonzalvo; M.F. Fernández; M.L. López; B. Leña; A. Mantilla; M. Rodríguez.  
Unidad de Reproducción del Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada  
[serranomolinamaria@gmail.com](mailto:serranomolinamaria@gmail.com)

### INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha incrementado el uso de pesticidas debido a su elevado rendimiento y fácil modo de aplicación por lo que se ha multiplicando su producción. En la actualidad existen miles de pesticidas registrados, algunos de ellos son ampliamente usados en la agricultura para el control de plagas. La exposición de humanos a pesticidas puede ocurrir no sólo por la aplicación en la agricultura, sino por la contaminación ambiental, distinguiéndose así entre exposición ocupacional y ambiental.

Los efectos adversos en la salud humana se presentan en el sistema respiratorio, renal, nervioso, endocrino, reproductor, siendo este último muy sensible a muchos agentes físicos y químicos generados por la actividad industrial o agrícola.

En los últimos 40 años se han publicado numerosos trabajos acerca del efecto de los pesticidas sobre la calidad seminal, existiendo discrepancias en las conclusiones obtenidas, debida en parte a la falta de estandarización en la metodología de estos estudios.

Recientemente se ha publicado una guía específica para calidad seminal para evaluar la calidad de dichos estudios.

### OBJETIVOS

Evaluar la calidad de los estudios de exposición ambiental frente a estudios

de exposición ocupacional a pesticidas persistentes mediante la guía SEMQUA.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó una búsqueda bibliográfica de la cual se analizaron 26 estudios que evaluaban la relación entre la exposición ocupacional a pesticidas persistentes y la calidad seminal y 20 trabajos que evaluaban la relación entre la exposición ambiental a pesticidas persistentes y la calidad seminal. El periodo de publicación de los trabajos está comprendido entre 1977 y 2012.

### RESULTADOS

Al comparar el grado de cumplimiento global de SEMQUA en artículos que estudian exposición ocupacional y el obtenido para estudios de exposición ambiental ( $39,6 \pm 18,2$  vs  $56,6 \pm 14,3$ ;  $p < 0.01$ ) se observan diferencias significativas. Se observa un aumento estadísticamente significativo del grado de cumplimiento de SEMQUA a lo largo de los años para estudios de exposición ocupacional ( $r=0.54$  y  $p < 0.01$ ). La media del año de publicación de los artículos de exposición ocupacional es inferior a la de los artículos de exposición ambiental ( $1990 \pm 11$  vs.  $2004 \pm 5$ ).

### CONCLUSIONES

Los estudios sobre calidad seminal y exposición ambiental a pesticidas persistentes tienen un mayor grado de cumplimiento de SEMQUA que los

estudios de exposición ocupacional debido a que han sido publicados más recientemente. La calidad de los estudios sobre calidad seminal y exposición a pesticidas persistentes ha mejorado a lo largo de los años, siendo esta mejora significativa para artículos de exposición ocupacional. Aunque la calidad de estos trabajos ha mejorado con los años aún no alcanza un nivel deseable.

## P-157: CORRELACIONES ENTRE PARÁMETROS SEMINALES Y FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO EN VARONES JOVENES

L. Sarabia Cos<sup>1,2</sup>, J.J. Areñe Gonzalo<sup>2</sup>, L. Mínguez Alarcón<sup>2</sup>, A. Cutilas Tolín<sup>2</sup>, J. Mendiola Olivares<sup>2</sup>, A.M. Torres Cantero<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Biología de la Reproducción. Quirón Dexeus Murcia, Murcia.

<sup>2</sup> División de Medicina Preventiva y Salud Pública. Universidad de Murcia, Murcia.

[laura.sarabia@quiron.es](mailto:laura.sarabia@quiron.es)

### INTRODUCCIÓN

El seminograma nos ayudan a definir el potencial fértil del varón pero no proporciona información sobre la integridad del ADN espermático. Varios estudios han analizado la relación entre los parámetros seminales clásicos del varón y la fragmentación del ADN espermático. Algunos de estos trabajos han mostrado que el índice de fragmentación espermática es significativamente mayor en pacientes con parámetros seminales alterados. Sin embargo, otros estudios muestran que la fragmentación espermática no siempre está relacionada con dichos parámetros. La mayoría de estos estudios se han llevado a cabo en varones de parejas que acuden a clínicas de fertilidad y son escasos los trabajos que han explorado estas asociaciones en otro tipo de poblaciones, como por ejemplo varones jóvenes.

### OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es estudiar la relación entre el índice de fragmentación del ADN espermático y los parámetros seminales establecidos

por la OMS (2010) en varones jóvenes voluntarios sanos.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio transversal realizado en jóvenes universitarios sanos (18-23 años) de la Región de Murcia (n=159) y llevado a cabo entre 2010 y 2011. Los participantes proporcionaron una muestra seminal y cumplimentaron cuestionarios epidemiológicos sobre hábitos de vida. Los análisis de parámetros seminales (volumen, concentración, recuento total, movilidad y morfología espermática) se realizaron siguiendo las recomendaciones de la OMS (2010). Se estudió la fragmentación del ADN espermático mediante el método de dispersión de la cromatina espermática (test SCD). El índice de fragmentación se definió como el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado con respecto al total de los espermatozoides analizados. Para cada muestra se estudiaron 300 espermatozoides. Se utilizó la correlación de Pearson (o Spearman si existía una distribución no normal) para analizar las asociaciones entre el porcentaje de fragmentación del ADN espermático y los distintos parámetros seminales. El nivel

de significación estadística se fijó en 0.05 y el paquete estadístico utilizado fue el SPSS 19.0.

### RESULTADOS

Se mostró una correlación negativa significativa entre el porcentaje de fragmentación de ADN espermático y la concentración ( $r=-0.20$ ; p valor  $<0.01$ ), recuento total ( $r=-0.19$ ; p valor  $<0.01$ ), movilidad ( $r=-0.13$ ; p valor  $<0.05$ ), y morfología espermática ( $r=-0.13$ ; p valor  $<0.05$ ). No se encontró relación con el volumen seminal.

### DISCUSIÓN

Nuestros hallazgos muestran una relación negativa entre la calidad seminal y el nivel de fragmentación del ADN espermático. Estos resultados concuerdan con algunos estudios previos realizados en pacientes infértiles o que acudían a clínicas de infertilidad. El que hayan podido reproducirse en jóvenes sanos, reafirma la hipótesis de la potencial importancia de la fragmentación de ADN espermático como herramienta en el estudio de la infertilidad masculina.

## P-158: GRUPO SANGUÍNEO Y EMBARAZO EN OVODONACIÓN

A. Fernández Martín, M. Dorado, B. Migueles, M. Hebles, L. Aguilera, M. González, P. Sánchez

Ginemed clínicas, Sevilla, Sevilla

[ana\\_f.m@hotmail.com](mailto:ana_f.m@hotmail.com)

### INTRODUCCIÓN

Actualmente, para determinar la reserva ovárica se utilizan determinaciones hormonales basales como son, la determinación sérica

de la LH, FSH y E2 entre los días 1-4 del ciclo menstrual, progesterona a mitad de la fase lútea, hormona antimuleriana e inhibina B y ecografía ginecológica para determinar folículos antrales.

Varios estudios han relacionado valores de FSH con el grupo sanguíneo de la paciente, dando como resultado una menor reserva en las pacientes infértiles de Grupo 0, mientras que el antígeno A puede tener un efecto protector (1),



además debido a esa mejor respuesta o mejor reserva otros autores han relacionado un aumento en la incidencia de SHO en pacientes del grupo A (2).

#### OBJETIVO

Nuestro objetivo fue valorar si los grupos sanguíneos pueden influir también en la reserva ovárica en pacientes fértiles como son las donantes de ovocitos y por ende en la tasa de embarazo de las receptoras cuando su donante pertenece al grupo A.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Para obtener los datos realizamos una búsqueda en nuestra base de datos de todos los ciclos de donación con óvulos en fresco que se habían realizado en la clínica entre enero de 2010 y octubre de 2012.

#### RESULTADOS

Analizamos un total de 1013 transferencias a receptoras, de las cuales 351 recibieron óvulos de donantes con grupo A, 595 recibieron óvulos de donantes con grupo O, 73 recibieron óvulos de donantes con grupo B y 4 recibieron ovocitos de donantes con grupo AB.

El estudio estadístico se realizó mediante Chi-Square Tests, con el programa estadístico SPSS v.17. Partimos de dos hipótesis: H0: % embarazo del grupo sanguíneo A=B=O=AB y H1: no son iguales

Obtuvimos como resultado una  $p=0.898$ , por lo que H0 NO se puede rechazar a un nivel de  $p<0.05$ .

#### CONCLUSIÓN

Según nuestros datos, el grupo sanguíneo de la donante no influye en las tasas de embarazo en los ciclos de ovodonación, habría que aumentar en número de casos en los ciclos de grupo sanguíneo B y AB para poder tener una concusión real al respecto de estos grupos.

1. Nejat E., Jundal S., Berger D. Implications of blood type for ovarian reserve. *Human Reproduction*.

2. H. Binder, W.A. Flegel, J. Emran et al. Association of blood group A with early-onset ovarian hyperstimulation syndrome. *Transfusion Clinique et Biologique* 15 (2008) 395-401

## P-159: ¿ESTA CORRELACIONADA LA CALIDAD SEMINAL Y LA EDAD PATERNA CON EL PORCENTAJE DE APOPTOSIS?

A. Domingo; C. Anarte; N. Presilla; I. Calvo; E. Martínez; J.A. Agirregoikoa; G. Barrenetxea; J.L. de Pablo.  
Quirón Bilbao (Bizkaia).  
[adomingo.bil@quiron.es](mailto:adomingo.bil@quiron.es)

#### INTRODUCCIÓN

La Apoptosis o la muerte celular programada es el proceso ordenado de muerte de una célula ante estímulos extra o intercelulares. Los espermatozoides que se encuentran en eventos tempranos de apoptosis traslocan la fosfatidilserina (FS) a la parte exterior de la membrana plasmática. Estudios recientes asocian la apoptosis con la infertilidad masculina. Por otro lado, el análisis convencional del semen teniendo en cuenta la concentración, movilidad y morfología de la muestra, nos ayuda a estudiar la fertilidad en los varones. En la actualidad existen diversos trabajos que correlacionan la apoptosis y los parámetros seminales. De igual manera, los estudios que analizan el efecto que tiene la **edad paterna** sobre el éxito tras la aplicación de [técnicas de reproducción asistida \(TRA\)](#)

son escasos y aportan resultados contradictorios. Lo cierto es que la función [reproductiva masculina](#) es menos vulnerable que la femenina en cuanto al proceso de envejecimiento.

#### OBJETIVOS

1. Definir el efecto de la apoptosis en la calidad seminal (morfología, concentración y movilidad).
2. Evaluar si la edad paterna compromete el porcentaje de espermatozoides apoptóticos.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo observacional. Hemos analizado el porcentaje de apoptosis en 107 sujetos de edades comprendidas entre los 29 y 52 años. Todos ellos pacientes de la Clínica de Reproducción Asistida de Quirón Bilbao. El estudio se realizó durante el primer trimestre del 2013.

Los parámetros seminales (concentración, movilidad y morfología) fueron evaluados según los criterios de la OMS 2010.

La determinación de apoptosis en las muestras en fresco y capacitado se realizó mediante Anexina V-FITC/IP y citometría de flujo.

El coeficiente de correlación de Pearson se ha calculado para correlacionar el índice de apoptosis, los parámetros seminales y la edad paterna. Para ello hemos utilizado el software SPSS para Windows.

#### RESULTADOS

Los resultados sugieren que el porcentaje de apoptosis esta negativamente correlacionada con la morfología ( $r=-0.283$  y  $P=0.018$ ) y la movilidad espermática ( $r=-0.326$  y  $P=0.002$ ); y positivamente con el porcentaje de espermatozoides no-apoptóticos ( $r=0.425$  y  $P=0.000$ ).

En cambio la edad paterna no está correlacionada con la apoptosis.

#### CONCLUSIONES

Los resultados confirman que es habitual tener espermatozoides

apoptóticos en el fluido seminal y demuestran que la apoptosis depende de la condición patológica del paciente. Parece que la apoptosis es el resultado final de varias patologías y de la desregulación de los sistemas de control de la espermatogénesis. Por otro

lado, nuestro estudio no demuestra el deterioro de los espermatozoides con la edad.

## P-160: ¿ES LA SELECCIÓN DE DONANTES UN BUEN REFLEJO DE LA EVOLUCIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL EN LA POBLACIÓN GENERAL?

E. Sellés Soriano; N. Garrido; N. Salinas; B. Losa; E. Martínez; M. Muñoz.

IVI Alicante

[elena.selles@ivi.es](mailto:elena.selles@ivi.es)

#### INTRODUCCIÓN

Existen varios estudios que sostienen que la calidad seminal ha disminuido en las últimas décadas debido a diferentes causas como la exposición ambiental a ciertos agentes, nuevos hábitos de vida, disruptores endocrinos, etc. (Sellés et al 2010, Mukhopadhyay et al. 2010). Por ello pretendemos mostrar un estudio retrospectivo en el que se evalúa la calidad seminal correspondiente a aspirantes a donantes de semen en nuestro centro desde el 2006, que aunque no se alcance una década, se intenta establecer o buscar una relación entre la tasa de rechazo, por no cumplir con los requisitos necesarios en cuanto a parámetros de calidad seminal, y el estado de la población en general según otros estudios que evalúan el descenso de esta calidad durante los últimos años y según la última edición de la OMS que también lo corrobora.

#### OBJETIVOS

Conocer si la calidad seminal de los donantes y su tasa de rechazo es un buen reflejo de la evolución de la calidad seminal con el tiempo y del estado actual en la población general.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron 315 muestras de semen de donantes desde el año 2006 hasta el 2012. Las muestras de obtuvieron por

masturbación tras la recomendación de un periodo de abstinencia sexual entre 3-5 días. Se realizó en todas ellas un examen macro y microscópico de los parámetros seminales: aspecto, ph, volumen, concentración, movilidad y morfología. Se analizaron un mínimo de 2 muestras distintas de cada donante para confirmar el resultado. Se rechazaron para nuestro programa de donantes aquellos que no obtenían un diagnóstico de normozoospermia por encima de los criterios de la OMS del 1999, es decir, aquellos que eran oligozoospermicos, astenozoospermicos, teratozoospermicos, hipospermicos o combinados. Excluyendo de este estudio aquellos donantes rechazados por otros motivos como genéticos, psicológicos u otros.

#### RESULTADOS

Año	N evaluados	N rechazados	Tasa de rechazo
2006	21	7	33%
2007	46	19	41,3%
2008	58	23	39,6%
2009	81	39	48,1%
2010	45	22	48,8%
2011	29	16	55,17%
2012	34	18	52,94%

Se evaluó la tasa de rechazo en cada año estudiado y se aplicó el análisis de Chi-cuadrado (Chi-square: 1,916, p-valor: 0.96). En los resultados se observa cierta tendencia a aumentar las tasas de

rechazo por cada año evaluado, pero sin ser estadísticamente significativo.

#### CONCLUSIONES

Aunque parece advertirse cierta tendencia a aumentar las tasas de rechazo, en periodos tan cortos de tiempo, en nuestra población de candidatos a donantes, no es estadísticamente significativo. Como los resultados son representativos de la población joven principalmente alicantina y no de la población general, este estudio se debería complementar con otros y en los años siguientes para confirmar si el descenso de calidad seminal o el aumento de las tasas de rechazo siguen la misma tendencia.

## P-161: INFLUENCIA DE LOS ANTIOXIDANTES EN LA TASA DE EMBARAZO

V. Masedo; T. Rubio; C. Carrascosa; J. Escobar; C. López; E. López  
Unidad de Reproducción Hospital La Vega, Murcia.  
[ura@hospitallavega.es](mailto:ura@hospitallavega.es)

### OBJETIVOS

Analizar si el tratamiento con antioxidantes (tipo combinado: Andromás o tipo único: Gesta DHA) en varones subfértiles tiene una influencia positiva en la tasa de embarazo frente a varones subfértiles que no han recibido ningún tipo de tratamiento y presentan también alguna alteración en los parámetros seminales.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio prospectivo aleatorio realizado en nuestra Unidad de Reproducción del Hospital La Vega, Murcia.

Se analizan 2 grupos: **Grupo A** utilizado como grupo control (43 ciclos: 10 IAC y 33 ICSI) formado por mujeres menor o igual a 41 años, causa de esterilidad masculina y cuyas parejas que presentaban alguna alteración seminal (asteno y/o oligozoospermia)

no fueron tratados con antioxidantes. **Grupo B** (43 ciclos: 10 IAC y 33 ICSI) con iguales criterios de inclusión salvo que en este grupo los varones fueron tratados al menos durante un mes con antioxidantes (Gesta DHA o Andromás).

Se analiza: recuperación de espermatozoides móviles (REM), tasa de embarazo y tasa de aborto.

Estudio estadístico realizado mediante *chi-cuadrado* y *t-student*.

### RESULTADOS

Si analizamos el REM obtenido en ambos grupos al inicio del estudio y posteriormente el día de la técnica realizada, observamos una mejora encontrando diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en el grupo tratado con antioxidantes pasando de 3,5 M a 6 M. El REM obtenido en el grupo control se mantiene muy

similar en ambos momentos 7,6 M vs 7,7 M sin diferencias estadísticas.

Tras comparar la tasa de embarazo en ambos grupos, aunque ésta presenta una tendencia positiva en el grupo de antioxidantes 34,8 % vs 23,3 % grupo control, no se han hallado diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ). La tasa de aborto fue similar en ambos grupos 30% grupo A vs 33% grupo B.

### CONCLUSIÓN

Observamos que la tasa de embarazo en el grupo tratado con antioxidantes durante mínimo un mes presenta una tendencia a aumentar frente al grupo que no realizó tratamiento. El no conseguir significación estadística posiblemente es debido al bajo de casos, lo que nos anima a continuar ampliando el estudio para confirmar la influencia de los antioxidantes en la tasa de gestación.

## P-162: RELACIÓN ENTRE LA CANTIDAD DE DEPORTE Y LA CALIDAD SEMINAL

P. Ibáñez, A. Brotons, A.A. Fernández-Peinado, A. Moya-Yeste  
Clínica In Vitam Centro de Medicina Reproductiva. Elche. Alicante  
[info@invitam.es](mailto:info@invitam.es)

### INTRODUCCIÓN

La actividad física tiene un amplio rango de efectos en la función reproductiva dependiendo de la intensidad y la duración del ejercicio, de la forma física o el estado de salud del individuo y de su estado nutricional.

No existen muchos estudios que expliquen la regulación hormonal en atletas varones, pero algunas evidencias sugieren que la práctica de un ejercicio físico relativamente corto produce un incremento en los niveles de testosterona en suero. En cambio, si el ejercicio es prolongado se da un

incremento inicial seguido de una disminución hacia los niveles basales o por debajo de los mismos.

### OBJETIVOS

Este proyecto tiene como fin estudiar la posible relación entre la cantidad

de actividad física realizada y las variaciones en los parámetros seminales.

## MATERIAL Y MÉTODOS

20 varones voluntarios de entre 18 y 36 años se sometieron a un análisis de semen, cumplimentando previamente un cuestionario donde se les preguntó entre otras cuestiones acerca de la frecuencia con la que practicaban ejercicio semanalmente. Se pidió una abstinencia previa entre 3 y 5 días siguiendo los criterios de la OMS. Se agruparon en tres categorías. Un primer grupo que no practica ejercicio. Un segundo grupo que realiza actividades físicas de 1 a 3 veces por semana y

finalmente un tercer grupo que practica ejercicio más de 3 veces a la semana. Se sometieron los datos a un análisis estadístico (ANOVA), comparando los valores de los distintos parámetros seminales.

## RESULTADOS

Hemos encontrado diferencias no significativas en los resultados obtenidos. Por un lado muestran un aumento en el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos en aquellos voluntarios que realizan deporte frente a los sedentarios. Por otro lado, se observa una disminución de la concentración en aquellos voluntarios que realizan deporte más

de 3 veces a la semana frente a los que realizan una actividad física moderada.

## CONCLUSIÓN

Siempre se ha considerado el deporte como un beneficio para la salud del individuo pero hay ocasiones en las que los efectos pueden ser contraproducentes ya que un exceso de ejercicio y las ganas de conseguir unas metas pueden crear situaciones de estrés que pueden empeorar la calidad seminal.

Nos encontramos trabajando aumentando la n de este estudio para intentar conseguir resultados estadísticamente significativos en todos los parámetros.

## P-163: TASAS DE EMBARAZO ACUMULADAS EN PROGRAMA DE IAD POR GRUPOS DE EDAD

L. Rodríguez, M. Mandiola, M. Soubelet, A. Arregi, K. Carbonero, F. Atutxa, Y. Álvarez, J. Martínez-Amuchástegui, I. Gómez.  
Unidad de Reproducción Asistida. Hospital Quirón Donostia. San Sebastián.  
[unidadrep.ss@quiron.es](mailto:unidadrep.ss@quiron.es)

Realizamos un estudio retrospectivo con los datos de 1824 ciclos de Inseminación Artificial con semen de Donante (IAD) que disponemos en nuestra unidad de Reproducción Asistida desde el año 2004. Nuestro objetivo es analizar las tasas de embarazo obtenidas en los ciclos de IAD, la tasa de embarazo acumulada tras cuatro intentos, así como las tasas de aborto. También dividimos a nuestras pacientes en diferentes grupos en función de la edad. Los grupos son los siguientes:

- Grupo 1: ≤30 años (221 ciclos)
- Grupo 2: 31-34 años (502 ciclos)
- Grupos 3: 35-39 años (721 ciclos)
- Grupo 4: 40-44 años (380 ciclos)

Podemos observar que la tasa global de embarazo/ciclo va disminuyendo a medida que vamos realizando intentos sucesivos (34,96%, 26,41%, 22,71%, 17,53% respectivamente en los intentos 1, 2, 3 y 4) siendo la tasa de embarazo global de 29,33% por ciclo.

La tasa global de embarazo acumulada tras 4 intentos, sin tener en cuenta la edad, es del 80,82%, aunque se observan grandes diferencias al analizar los datos por grupos de edad, obteniéndose, como es de esperar, una mayor tasa en el grupo 1 y disminuyendo progresivamente hacia el grupo 4.

La tasa de aborto general es de 28,22%. Lógicamente, se observa

un incremento a medida que va avanzando la edad de las pacientes (20,99%, 23,84%, 28,49% y 50,88% respectivamente en los grupos de edad 1, 2, 3 y 4).

Podemos concluir que el programa de IAD es un tratamiento que proporciona muy buenos resultados, además de ser sencillo y repetitivo, siempre y cuando esté correctamente indicado.

	EDAD				
CICLO	1 (≤30)	2 (31-34)	3 (35-39)	4 (40-44)	TOTAL
1º	46,67%	41,70%	31,38%	20,78%	34,96%
2º	71,93%	66,80%	48,86%	34,27%	54,99%
3º	85,85%	78,51%	52,49%	48,76%	70,65%
4º	91,18%	86,85%	80,00%	59,80%	80,82%

## P-164: TRANSFERENCIA EMBRIONARIA EN DÍA +3 VS DÍA +5 EN PACIENTES QUE HAN REALIZADO UN CICLO DE FECUNDACIÓN IN VITRO CON OVOCITOS PROPIOS

C. Mangrané; I. Boiso; M. Rius; N. Rives; J. Herrero; L. Marquès; J.J. Espinós,  
Centre de Reproducció Assistida. Clínica Sagrada Família. Barcelona.  
cmangrane@reproduccion-asistida.com

### INTRODUCCIÓN

Varios estudios muestran que la presencia de aneuploidías, así como de otras alteraciones cromosómicas, no se correlaciona con la valoración morfológica realizada en el estadio de 2 a 8 células. Esta asincronía morfogénica se podría explicar por la inactividad del genoma embrionario en esta fase del desarrollo.

La evolución de los medios de cultivo ha permitido plantearse la transferencia de embriones en un estadio de desarrollo más avanzado en el que, probablemente, el porcentaje de embriones aneuploides sea inferior.

### OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio es comparar los resultados obtenidos al realizar la transferencia embrionaria en día +3 o día +5 de evolución.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo de dos grupos de pacientes que fueron sometidas

a un tratamiento de Fecundación *in vitro*, con ovocitos propios, desde septiembre de 2011 hasta la actualidad. Únicamente se incluyeron pacientes que en día+3 tenían 4 o más embriones de calidad A y/o B (según criterios de valoración morfológica de ASEBIR). Un total de 65 parejas reunieron los criterios de selección. En el grupo I (n=48) la transferencia de embriones se realizó en día+3. En el grupo II (n=17) se realizó en día+5. El análisis estadístico utilizado para la comparación de las medias fue el test de Mann-Whitney. Los datos en porcentajes fueron comparados mediante el test de Fisher.

### RESULTADOS

No se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos estudiados, en cuanto a la edad (35,5±2,9 vs 34,5±3,8 años), el número total de ovocitos recuperados (13±5,2 vs 15,9±5,8), el número de ovocitos metafase II (11±4,3 vs 14,1±5,0), la tasa de fecundación (85,8% vs 87,0%), ni en la calidad de los embriones en día +3 (34,5% vs 39%

de calidad A) por lo que ambos grupos fueron comparables.

Transfiriéndose un número similar de embriones en cada grupo (1,88 vs 1,65; p=ns), las tasas de gestación (50,0% vs 70,6%; p=ns), de gestación evolutiva (43,8% vs 47,1% p=ns) y de gestación acumulada (54,2% vs 76,5% p=ns) también fueron similares en el grupo I y II.

### CONCLUSIONES

En este estudio se ha observado una tendencia al aumento de la tasa de gestación en el grupo de pacientes a las cuales se transfirieron embriones en estadio de blastocisto, pero sin diferencias estadísticamente significativas. Esto podría deberse al reducido número de pacientes estudiadas en el grupo II. Por este motivo, es necesario ampliar el número de casos para confirmar esta tendencia.

## P-165: EFECTO DE DOS MEDIOS DE ACTIVACIÓN ESPERMÁTICA EN LA MOTILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES DE PEZ CEBRA (DANIO RERIO)

S. Sadeghi<sup>1</sup>, A. García-Molina<sup>2</sup>, C. Soler<sup>1</sup>, M.A. Silvestre<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Biología Funcional i Antropología Física. Universitat de València. Burjassot, Spain. <sup>2</sup> Universitat de València/Proiser R+D, S.L., Paterna, Spain  
[miguel.silvestre@uv.es](mailto:miguel.silvestre@uv.es)

### INTRODUCCIÓN

En contacto con un medio hipoosmolar, los espermatozoides del pez cebra

se activan y su motilidad se prolonga durante un tiempo. El rango de osmolaridades de los medios de activación espermática que se han

estudiado es amplio, siendo aquellas osmolaridades medias (~80-160 mosm/kg; Wilson-Leedy et al., 2009) las que mantiene durante más tiempo la



motilidad espermática en comparación con las bajas osmolaridades.

#### OBJETIVOS

El objetivo consistió en el estudio de la motilidad de los espermatozoides de pez cebra sometidos a dos medios de activación a lo largo del tiempo hasta casi su pérdida total de motilidad.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Los eyaculados se obtuvieron de peces cebra adultos (*Danio rerio*) que se criaban bajo fotoperiodo (14h luz y 10h oscuridad). Los machos se anestesiaban por inmersión en una solución que contenía aceite de clavo. Una vez inmóviles, se recogieron los eyaculados mediante un capilar tras un ligero masaje en la zona ventral. Los eyaculados de al menos tres animales se mezclaron formando un "pool" en la solución HBSA (100ml Hank's + 1,5g BSA + 0,1g NaCl) cuya osmolaridad era de 325 mosml/kg que permite que los espermatozoides de pez cebra no se activen y este "pool" se guardó en nevera hasta su evaluación. Los medios de activación espermática estudiados fueron: Agua desionizada (DES: 2,5 mosml/kg) y agua de sistema

(agua de grifo reposada 24h; SIS: 25,0 mosml/kg). Se mezclaron 10 µl de medio de activación con 5 µl del grupo de semen, siendo al osmolaridad de 110 and 125 mosml/kg para el grupo DES y SIS respectivamente. Se evaluaron los parámetros "Velocidad Curvilínea" (VCL; µm/s) e "Índice de Linealidad" (LIN; %) en aquellos espermatozoides que presentaban motilidad y el % de espermatozoides estáticos medidos con el sistema CASA (ISAS, Proiser) a lo largo del tiempo que era de aproximadamente 120-150 segundos que fue lo que se tardó en realizar 15 capturas de vídeo (escala de tiempo) del mismo campo. Se realizaron dos réplicas de cada pool de eyaculados y se realizaron 3 sesiones (3 pool). Los resultados de los parámetros VCL y LIN se analizaron por modelo lineal generalizado y el % de inmóviles se analizó por medio de regresión logística con los factores medio de activación, escala de tiempo, sesión, réplica y las interacciones dobles para todos los análisis (Spss statistics).

#### RESULTADOS

El medio de activación no afectó al parámetro VCL (45,3±0,3 y 45,2±0,3 para DES y SIS respectivamente);

tampoco se observaron diferencias significativas en el parámetro LIN (70,2±0,4 y 69,3±0,4 para DES y SIS respectivamente) y las interacciones dobles de estos parámetros con la escala de tiempo. El parámetro VCL descendía bruscamente durante los primeros 60s (captura 8) desde valores superiores a 80 µm/s hasta valores por debajo de 40 y después de manera más moderada. El parámetro LIN se incrementaba al inicio de la activación y tras aproximadamente 45s (captura 6) descendía. Respecto a los espermatozoides estáticos, el sistema de activación DES mostraba una menor tasa global de estáticos en comparación con el SIS (36,5% y 41,0% para DES y SIS respectivamente, P<0,05).

#### CONCLUSIONES

El tipo de medio de activación espermática afectó al ratio de motilidad de los espermatozoides de pez cebra, sin embargo es conveniente realizar más estudios extendiendo los rangos de osmolaridad y los parámetros estudiados para conocer los mecanismos de acción con detalle. MAS fue financiado por Subprograma RyC.

## P-166: LA POSICIÓN DE LAS PLACAS DE CULTIVO DENTRO DEL INCUBADOR NO INFLUYE EN EL ÉXITO DE LOS TRATAMIENTOS DE FECUNDACIÓN IN VITRO

L. Vidal; Z. González; S. Corral; P. Rollán; E. Fernández; M. Iglesias  
Hospital Universitario Quirón Madrid, Pozuelo de Alarcón, Madrid  
[miriamen1@yahoo.es](mailto:miriamen1@yahoo.es)

#### INTRODUCCIÓN

Las condiciones subóptimas de cultivo obligan a los embriones a realizar adaptaciones y compensaciones durante su evolución. Estos ajustes podrían estar relacionados con baja calidad embrionaria y descenso en las tasas de gestación. Se han desarrollado varias generaciones de medios de cultivo, de la misma forma que los equipos de

los laboratorios de reproducción han mejorado notablemente. Sin embargo, hay pocos estudios que investiguen los efectos del manejo de los incubadores convencionales, tales como la posición de los embriones en su interior.

#### OBJETIVO

Hemos realizado un estudio retrospectivo con el fin de determinar

si existen diferencias en los resultados de los tratamientos de fecundación in Vitro, en función de cuál de las tres baldas ocupen los embriones durante su cultivo.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio transversal en 625 parejas que llevaron a cabo tratamientos de reproducción asistida

en nuestro centro entre Enero de 2011 y Diciembre de 2012. En todas ellas se empleó el mismo protocolo de estimulación (antagonista corto), metodología de laboratorio (fecundación in Vitro convencional o microinyección espermática) y medios de cultivo (Vitrolife, Göteborg, Suecia). Las placas de cultivo de embriones se posicionaron aleatoriamente en una de las tres baldas de los incubadores (C60, Labotect, Göttingen, Alemania). Las condiciones de cultivo fueron de 37°C de temperatura, 6% de concentración de CO<sub>2</sub> y humedad relativa de 93-95%. La calidad de los embriones fue valorada siguiendo los criterios de la clasificación de ASEBIR. Las transferencias de embriones se realizaron en día 2 de cultivo si se disponía de hasta 4 embriones, y en día 3 si se disponía de 5 o más

embriones. Tras la transferencia, los embriones que no fueron transferidos ni criopreservados, se cultivaron con el fin de intentar conseguir embriones en estadio de blastocisto.

### RESULTADOS

La comparación entre los distintos grupos se efectuó mediante el test de Tukey. Se empleó el test de ANOVA para los datos cuantitativos y X<sup>2</sup> para los categóricos. Se consideró estadísticamente significativo un valor  $P < 0,05$ . Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa SPSS. La distribución de las pacientes fue homogénea ( $P > 0,1$ ), colocándose 223 casos en la balda superior, 236 en la intermedia y 166 en la balda inferior. Se estudió la tasa de fecundación, la calidad embrionaria, el número

de blastocistos conseguidos tras el cultivo y las tasas de gestación e implantación según qué balda ocuparan los embriones durante su incubación. Ninguno de los parámetros estudiados mostró diferencias estadísticamente significativas en función de su posición dentro del incubador.

### CONCLUSIÓN

Existen autores que concluyen que la tasa de embarazo clínico es dos veces mayor cuando los embriones se cultivan en la balda intermedia (Higdon et al., 2008). Sin embargo, según nuestros resultados pensamos que es indiferente qué posición de los incubadores C60 ocupen los embriones, ya que no se observan diferencias significativas en las calidades embrionarias ni en los resultados de los tratamientos.

## P-167: UTILIZACIÓN DEL ÁCIDO HIALURÓNICO PARA LA SELECCIÓN ESPERMÁTICA EN CICLOS ICSI. RESULTADOS

M.V. Aparicio; O. Ramón; M.R. Mendoza; R. Matorras

Unidad de Reproducción Humana del Hospital Universitario de Cruces – Barakaldo - Bizkaia

[m.victoria.aparicioprieto@osakidetza.net](mailto:m.victoria.aparicioprieto@osakidetza.net)

### INTRODUCCIÓN

La introducción de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) a principios de 1990, fue uno de los avances más espectaculares para solventar los problemas de fertilidad masculina severa. Desde entonces se han descrito varias técnicas para mejorar la selección del espermatozoide y utilizar aquel espermatozoide con menos anomalías, y con menor grado de fragmentación del ADN, ya que el daño del ADN espermático, se asocia con un aumento significativo del riesgo de pérdida de embarazo después de FIV o ICSI. Una de esas técnicas es la utilización del Ácido Hialurónico, con el cual se intenta seleccionar aquel espermatozoide con un menor grado de fragmentación de su ADN y más adecuado para la microinyección.

### OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es valorar la utilización del Ácido Hialurónico para la selección del mejor espermatozoide para la microinyección intracitoplasmática del mismo, y comparar los resultados con nuestros propios resultados.

### MATERIAL Y MÉTODOS

En nuestra Unidad de Reproducción Humana empezamos a utilizar el Ácido Hialurónico en el 2010, (Sperm Slow, Origio), y hasta la actualidad se han seleccionado 54 ciclos de ICSI, estos casos tenían como indicaciones fracasos de IAC, abortos de repetición, niveles de fragmentación del ADN espermático superiores al 15% y fracasos previos de ICSI. Para la selección espermática se ha utilizado la técnica descrita por Parmegiani (2010).

### RESULTADOS

El porcentaje de pacientes con transfer por ciclo fue del 92,59 %.

La tasa de embarazo por transferencia fue del 30%. La tasa de abortos el 26,66%, y la de ectópico del 6,66%.

La tasa de implantación fue del 19,31%, y la de embarazo evolutivo del 66,66%. De los cuales el 80% corresponden a embarazos simples y el 20% a gemelares.

### CONCLUSIONES

No hemos encontrado diferencias en los resultados de los ciclos en los que se seleccionó el espermatozoide con Ácido Hialurónico, con los ciclos en los que no se utilizó dentro de la población general de nuestra Unidad de Reproducción.

## P-168: DISGENESIA GONADAL MIXTA EN CARIOTIPO MOSAICO 46 XY, 45 XO

M.C. Gonzalvo; A. Mantilla; M.L. López; S. Carrillo; B. López; M. Serrano; M. Rodríguez; J. Fontes  
Unidad de Reproducción del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada  
[serranomolinamaria@gmail.com](mailto:serranomolinamaria@gmail.com)

### INTRODUCCIÓN

El mosaicismo cromosómico está definido como la condición en donde un individuo tiene dos o más poblaciones de células que difieren en su composición genética. El mosaicismo 46XY/45XO puede dar lugar a una amplia variedad de fenotipos que abarcan desde mujeres con estigmas de síndrome de Turner, varones o mujeres con pseudohermafroditismo, y varones fenotípicamente normales. En varones estériles es un hallazgo infrecuente este mosaicismo, habiéndose relacionado por algunos autores a inestabilidad del cromosoma Y.

### CASO CLÍNICO

Paciente de 32 años, sin antecedentes de interés, con relaciones heterosexuales y sin disfunción eréctil ni eyaculatoria, en seguimiento en la Unidad de Reproducción del Hospital Universitario Virgen de las Nieves por esterilidad primaria de tres años de evolución.

### PRUEBAS DIAGNÓSTICAS:

Se realizaron 2 análisis de semen (oct. 2012, dic. 2012) sin presencia de

espermatozoides tanto en fresco como en centrifugado, el pH y el volumen eran normales. El informe del urólogo informa de testículos descendidos en escroto, Testículo Izquierdo muy doloroso con engrosamiento del cordón y el epidídimo y el Testículo Derecho doloroso. El análisis hormonal nos dió un valor de FSH 20,89 mUI/mL, la LH era de 15,19 mUI/mL y la testosterona de 5,32 ng/mL. Su cariotipo detectó una fórmula cromosómica de 46 XY (21%)/45 XO (79%). Al examinar el DNA de muestras de sangre periférica para averiguar si existían microdeleciones del cromosoma Y se observaron deleciones en las regiones AZFb y AZFc.

### TRATAMIENTO:

Debido a las deleciones combinadas en la regiones AZF b+c, que están relacionadas con baja o ninguna recuperación de espermatozoides en una biopsia testicular, no se indica ICSI en este paciente. En la URH se le da como opción reproductiva a la pareja la donación de semen. A parte de esto, el paciente está pendiente

para hacerse una ecografía testicular y posteriormente, con todos los informes y pruebas realizadas, pedir consejo genético.

### CONCLUSIONES

Las causas genéticas mejor conocidas que repercuten en la fertilidad masculina son cariotipos anormales, mutaciones en genes de la fibrosis quística y microdeleciones del Y. Centrándonos en esta última, hay estudios que asocian su etiología con una inestabilidad del cromosoma Y, la cual altera el reordenamiento cromosómico de Y y puede predisponer a que haya un retraso en la anafase y como consecuencia aparezca dichas microdeleciones. Nuestro estudio confirma dicha teoría pues la asociación entre este mosaicismo y microdeleciones del cromosoma Y encontradas en nuestro paciente hablaría de que son efectos de una misma etiología. Así, podría aparecer tanto la línea celular 45XO, llevando a un trastorno del desarrollo sexual, como microdeleciones del cromosoma Y menos graves.

## P-169: TRANSFERENCIA EMBRIONARIA EN DÍA +3 VS DÍA +5 EN PACIENTES QUE HAN REALIZADO UN CICLO DE FECUNDACIÓN IN VITRO CON OVOCITOS DE DONANTE

C. Mangrané; I. Boiso; M. Rius; N. Rives; J. Herrero; L. Marquès; J.J. Espinós.  
Centre de Reproducció Assistida. Clínica Sagrada Família. Barcelona.  
[cmangrane@reproduccion-asistida.com](mailto:cmangrane@reproduccion-asistida.com)

### INTRODUCCIÓN

Varios estudios muestran que la presencia de aneuploidías, así como

de otras alteraciones cromosómicas, no se correlaciona con la valoración morfológica realizada en el estadio de 2 a 8 células. Esta asincronía

morfogenética se podría explicar por la inactividad del genoma embrionario en esta fase del desarrollo.

La evolución de los medios de cultivo ha permitido plantearse la transferencia de embriones en un estadio de desarrollo más avanzado en el que, probablemente, el porcentaje de embriones aneuploides sea inferior.

#### OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio es comparar los resultados obtenidos al realizar la transferencia embrionaria en día +3 o día +5 de evolución.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo de dos grupos de pacientes que fueron sometidas a un tratamiento de Fecundación *in vitro*, con ovocitos de donante, desde septiembre de 2011 hasta la actualidad. Únicamente se incluyeron pacientes que en día+3 tenían 4 o más embriones de calidad A y/o B (según

criterios de valoración morfológica de ASEBIR). Un total de 81 parejas reunieron los criterios de selección. En el grupo I (n=50) la transferencia de embriones se realizó en día+3. En el grupo II (n=31) se realizó en día+5. El análisis estadístico utilizado para la comparación de las medias fue el test de Mann-Whitney. Los datos en porcentajes fueron comparados mediante el test de Fisher.

#### RESULTADOS

No se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos estudiados, en cuanto a la edad ( $26,9\pm 4,3$  vs  $25,7\pm 4,0$  años), el número total de ovocitos recuperados ( $12,7\pm 3,6$  vs  $14,9\pm 5,2$ ), el número de ovocitos metafase II ( $10,8\pm 3,0$  vs  $12,9\pm 4,8$ ), la tasa de fecundación ( $88,5\%$  vs  $90,3\%$ ), ni en la calidad de los embriones en día +3 ( $49,4\%$  vs

$43,3\%$  de calidad A), por lo que ambos grupos fueron comparables.

Transfiriéndose un número similar de embriones en cada grupo ( $1,96$  vs  $1,68$ ;  $p=ns$ ), las tasas de gestación ( $72,0\%$  vs  $83,9\%$ ;  $p=ns$ ), de aborto ( $22,2\%$  vs  $23,1\%$   $p=ns$ ) y de gestación acumulada ( $74\%$  vs  $87,1\%$   $p=ns$ ) también fueron similares en el grupo I y II.

#### CONCLUSIONES

En este estudio se ha observado una tendencia al aumento de la tasa de gestación en el grupo de pacientes a las cuales se transfirieron embriones en estadio de blastocisto, pero sin diferencias estadísticamente significativas. Esto podría deberse al reducido número de pacientes estudiadas en el grupo II. Por este motivo, es necesario ampliar el número de casos para confirmar esta tendencia.

## P-170: RESULTADOS DE FIV/ICSI EN RELACIÓN CON LA EDAD DE LA MUJER. NUESTRA EXPERIENCIA

M. Tresguerres<sup>1</sup>, V. Castañón<sup>2</sup>, I. Arnott<sup>1</sup>, A. Gayo<sup>1</sup>, M. Torrents<sup>2</sup>, P. Llana<sup>2</sup>, D. Fernández<sup>2</sup>, J. Álvarez<sup>2</sup>, E. Fernández<sup>2</sup>, L. Sánchez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Reproducción Humana FIV4, Oviedo, Asturias. <sup>2</sup>Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Asturias

[maria@fiv4.es](mailto:maria@fiv4.es)

#### INTRODUCCIÓN

Los marcadores de Reserva Ovárica (RO) nos ayudan a ajustar la dosis de gonadotropinas en un protocolo de estimulación ovárica, sin embargo no hay ningún test que por sí solo sea predictivo de la respuesta, siendo la edad de la mujer uno de los factores más importantes a la hora de valorar las posibilidades de éxito.

La calidad embrionaria, medida según los criterios de morfología de ASEBIR, es uno de los parámetros de más peso y que estudiada en el día de la transferencia está directamente relacionada con la posibilidad de embarazo.

#### OBJETIVOS

En este trabajo se pretende comparar los resultados obtenidos en la Unidad en dos grupos de pacientes, estableciendo la división entre ambos en 38 años, y ver cómo correlacionan los resultados con los marcadores de RO en los dos grupos estudiados, sin tener en cuenta el factor de esterilidad. Por otro lado, se estudia también otro de los factores limitantes del éxito, la calidad embrionaria, en función de la edad y también como factor único para predecir la respuesta.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este estudio observacional retrospectivo se

recogieron los datos de pacientes que realizaron tratamiento de FIV/ICSI, en la Unidad de RA del HUCA durante el período comprendido entre Enero de 2011 y Marzo de 2012. Se estudiaron un total de 363 ciclos. Se siguieron los protocolos habituales de estimulación con gonadotropinas y en el laboratorio la técnica habitual fue la ICSI. El cultivo de los embriones se llevó hasta día +2 ó +3. La TE se realizó guiada por ecografía y en la mayoría de los casos se transfirió un número de dos embriones.

#### RESULTADOS

No se observaron diferencias en el estradiol basal y la FSH basal entre los dos grupos de edad.

Las mujeres  $\geq 38$  años requirieron una mayor dosis de gonadotropinas y se obtuvieron un menor número de ovocitos y de embriones, de acuerdo con lo descrito en la bibliografía, sin llegar a ser estas diferencias significativas.

A la hora de estudiar la calidad embrionaria, se observa que los embriones tipo A están más presentes en las mujeres  $< 38$  años y el número de embriones tipo B es significativamente mayor en este grupo. Hubo un mayor número de mujeres  $\geq 38$  años que no obtuvieron ningún embrión tipo A. Por tanto, hay mejor calidad embrionaria en el grupo de las mujeres más jóvenes.

Las diferencias fueron significativas al comparar la calidad embrionaria con el resultado de la técnica, independientemente de la edad de la paciente. Las mujeres a las que no se les transfiere ningún embrión tipo A tienen una tasa de embarazo del 18,1% frente al 32,8% si se les transfiere un embrión de calidad A y una tasa del 44,4% si se les transfieren dos embriones de calidad A.

#### CONCLUSIONES

En esta población los marcadores de RO utilizados no muestran diferencias con la edad de la mujer, y su determinación

no sirve para predecir el resultado del tratamiento.

La edad de la paciente sí influye en el resultado de las TRA, siendo ésta más desfavorable a medida que aumenta la edad, pero lo que más influye en el éxito es la calidad embrionaria. Ésta es decisiva en la posibilidad de conseguir embarazo, siendo las pacientes  $< 38$  años y con embriones de calidad A las que más probabilidad tienen de conseguirlo.

## P-171: BIOPSIA EMBRIONARIA EN DIFERENTES ESTADIOS: VENTAJAS E INCONVENIENTES

C. Giménez; E. Garcia-Guixé; C. Arjona; A. Jiménez-Macedo; M. Sandalinas  
Reprogenetics, Barcelona  
[litus@reprogenetics.es](mailto:litus@reprogenetics.es)

#### INTRODUCCIÓN

El Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) se puede realizar en diferentes estadios de desarrollo embrionario. La biopsia en cada uno de ellos presenta ventajas e inconvenientes asociados, que deben tenerse en consideración antes de ofrecer a los pacientes una opción u otra.

#### OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es hacer una revisión sobre los pros y contras asociados a la biopsia embrionaria en diferentes estadios: corpúsculo polar (CP), día +3 y blastocisto.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Revisión bibliográfica.

#### RESULTADOS

Todas las opciones presentan ventajas e inconvenientes.

La biopsia de CP es la única opción aceptada en algunos países. El impacto de la biopsia en el embrión es muy bajo o nulo. Además, no existen errores de diagnóstico debidos a mosaicismo. Esta técnica es aplicable a todo tipo de pacientes, excepto en los que haya un factor masculino o cuando el portador de la anomalía genética (cromosómica o génica) es el varón. Geraedts y col (2011) obtuvieron una concordancia del 94% entre el resultado obtenido en el CP y el del cigoto, detectándose un 93% de las anomalías observadas en d+3 (Christopikou et al., 2013). No obstante, existen algunas controversias acerca de su fiabilidad (Capalbo et al., 2013). Presenta ciertos problemas metodológicos, principalmente, no se detectan los errores mitóticos ni las aneuploidías de origen paterno. Además, es una técnica larga, laboriosa y cara, ya que requiere la biopsia y análisis de 2 corpúsculos polares por cada embrión.

La técnica más ampliamente utilizada es la biopsia en d+3. Permite descartar aneuploidías tanto de origen materno como paterno y presenta un valor predictivo negativo del 98.1% (Scott et al., 2012). Sin embargo, existe cierta controversia sobre un posible efecto dañino de la biopsia sobre la viabilidad del embrión. Algunos estudios basados en la pérdida de masa celular post-descongelación (Cohen et al., 2007) reflejan una reducción en la tasa de implantación que se incrementa cuanto mayor es la pérdida celular. Además hay que considerar los efectos del mosaicismo sobre los resultados obtenidos. Wilton y col (PGDIS 2013) han cifrado en un 24% la tasa de mosaicismo en embriones en d+3, infiriendo una tasa de error clínico del 7% por esta causa.

Los mejores datos se obtienen con la biopsia de blastocisto (Yang et al., 2012; Schoolcraft et al., 2012). Presenta múltiples ventajas, como un mayor número de células para realizar el



análisis genético y un menor riesgo de error diagnóstico debido al mosaicismo. Además, el impacto de la biopsia sobre el embrión es muy bajo o nulo. Es una técnica que permite reducir los costes del análisis genético puesto que ya hay una selección embrionaria morfológica previa. Actualmente es compatible con transferencia embrionaria en fresco en d+6. Parece la técnica adecuada para la transferencia embrionaria de un único embrión (SET) puesto que permite escoger un embrión euploide y con un

elevado potencial de implantación. Como inconvenientes destacar que requiere un buen programa de cultivo largo en el laboratorio de FIV para obtener blastocistos y, al disponer de una reducida ventana de tiempo para dar resultado, la técnica de aCGH debe estar optimizada en el laboratorio de DGP.

#### CONCLUSIONES

La biopsia embrionaria en los distintos estadios de desarrollo tiene asociada

ventajas e inconvenientes, que deben conocerse a priori para poder ofrecer el mejor asesoramiento a los pacientes. Todo parece indicar que el mejor momento para realizar la biopsia es en estadio de blastocisto, puesto que al partir de un mayor número de células el análisis genético es más robusto. Además, el impacto de la biopsia sobre la viabilidad del embrión es muy bajo, y los costes del análisis son menores al haberse realizado un cribado morfológico previo.

## P-172: DETERMINANTES DE LA CALIDAD SEMINAL EN VARONES JÓVENES DEL SURESTE ESPAÑOL

L. Sarabia Cos <sup>1,2</sup>, J.J. Areñe Gonzalo<sup>2</sup>, L. Mínguez Alarcón <sup>2</sup>, A. Cutillas Tolín <sup>2</sup>, J. Mendiola Olivares <sup>2</sup>, A.M. Torres Cantero <sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Biología de la Reproducción. Quirón Dexeus Murcia, Murcia.

<sup>2</sup>División de Medicina Preventiva y Salud Pública. Universidad de Murcia, Murcia.

[laura.sarabia@quiron.es](mailto:laura.sarabia@quiron.es)

#### INTRODUCCIÓN

Existen diversos estudios que muestran una disminución de la concentración espermática en humanos durante los últimos 50 años. No obstante, esta conclusión no es unánime y las posibles causas de este fenómeno continúan siendo objeto de debate. Los datos son especialmente alarmantes en población joven. Estudios transversales de calidad seminal realizados en jóvenes del norte de Europa muestran que hasta un 20% presentan concentraciones espermáticas inferiores a los límites referenciados por la OMS (2010). Sin embargo, existen muy pocos datos acerca de la calidad seminal en poblaciones similares del sur de Europa y cuáles podrían ser sus determinantes.

#### OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es describir la calidad seminal y sus determinantes en varones jóvenes voluntarios sanos del sureste español.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio transversal realizado en jóvenes universitarios sanos (18-23 años) de la Región de Murcia (n=215) y llevado a cabo entre 2010 y 2011. Los participantes proporcionaron una muestra seminal, se les realizó un examen andrológico y cumplieron cuestionarios epidemiológicos sobre hábitos de vida. Los análisis de parámetros seminales (volumen, concentración, recuento total, movilidad y morfología espermática) se realizaron siguiendo las recomendaciones de la OMS (2010). Los determinantes a estudiar se relacionaron con: a) características de la muestra seminal (tiempo de abstinencia sexual, estación del año), b) examen físico (obesidad, presencia de varicocele) y c) hábitos de vida (consumo de tabaco, alcohol, cafeína, estrés y ejercicio físico). Se utilizó la correlación de Pearson, el test de chi-cuadrado o el análisis de la varianza (ANOVA) para analizar las relaciones entre los distintos factores

y los parámetros seminales. El nivel de significación estadística se fijó en 0.05 y el paquete estadístico utilizado fue el SPSS 19.0.

#### RESULTADOS

La media y desviación estándar (DE) de la edad y tiempo de abstinencia sexual fue de 19.2±5.5 años y 79.3±37.4 horas, respectivamente. Casi un 32% eran fumadores y un 15% presentó varicocele. La mediana de concentración espermática fue de 44.0 mill./ml [Rango intercuartil (RIC): 22.2-72.5] y la mediana de recuento espermático total fue de 121 millones (RIC: 65.8-214). La media y DE del porcentaje de motilidad espermática y de morfología normal fue de 56.5±10.9 y 10.3±6.3, respectivamente. En relación con los determinantes de la calidad seminal se observó una correlación positiva significativa entre el tiempo de abstinencia sexual y el volumen, concentración y recuento total espermático (p valores <0.01). La presencia de varicocele se relacionó

con una concentración espermática disminuida (44.0 vs. 53.9 mill./ml; p valor <0.05). El hábito tabáquico se asoció con un porcentaje menor de espermatozoides normales (p valor <0.05). El consumo de vino tinto se correlacionó con una mayor concentración espermática (59.1 vs. 49.8 mill/ml; p valor <0.05). El resto de variables estudiadas no mostraron ninguna relación significativa con los parámetros seminales.

#### CONCLUSIONES

La mitad de nuestra población de estudio presentó al menos 1 parámetro seminal por debajo de los valores de referencia de la OMS (2010). Los resultados son similares a los descritos en poblaciones del norte de Europa, pero subrayan el porcentaje relativamente alto de jóvenes con una calidad seminal alterada. Con respecto a los determinantes de la calidad seminal, nuestros resultados concuerdan en

parte con otros estudios publicados hasta el momento. La presencia de varicocele, el tabaquismo o el tiempo de abstinencia sí se han relacionado anteriormente con la calidad seminal. Sin embargo, no vemos asociación entre otros factores previamente señalados como la estación del año o la obesidad. Por tanto estos hallazgos sugieren que, como en otras ocasiones, los factores que determinan la calidad seminal podrían variar en función del tipo de población estudiada.

## P-173: LAS COLUMNAS DE ANEXINA V MEJORAN LA CALIDAD EMBRIONARIA Y LA TASA DE EMBARAZO EN PACIENTES CON CICLOS FALLIDOS DE ICSI

P. Ferrando; Y. Franco; E. Güell; A. Aguilar; J. Ibarz; J. Ruiz  
 Conceptum. Societat de Serveis Mèdics. Reus (Tarragona)  
[pferrog@yahoo.es](mailto:pferrog@yahoo.es)

#### INTRODUCCIÓN

La presencia de una elevada cantidad de espermatozoides apoptóticos y el ADN fragmentado tiene un impacto negativo sobre la fertilidad. De hecho, está relacionado con una baja tasa de implantación y un incremento en el número de abortos.

La apoptosis es un proceso programado de muerte celular. En el eyaculado encontramos espermatozoides que han iniciado este proceso y que, al tener motilidad y ser morfológicamente normales, no se están detectando bajo el microscopio. La fragmentación del ADN está asociada a procesos de apoptosis espermática y, tanto factores físicos como metabólicos pueden inducir el daño del ADN espermático. Uno de los marcadores de apoptosis en espermatozoides es, junto a la caspasa 3 y el p53, la externalización de la fosfatidilserina. Este fosfolípido tiene la capacidad de unirse a la anexina V.

#### OBJETIVO

Hacer una descriptiva de los casos realizados en la clínica utilizando las columnas MACS GMP y obtener el resultado preliminar. Además, observar si existen diferencias en la tasa de fecundación, tasa de embarazo y calidades embrionarias en ciclos de pacientes a los que se les realizaron tratamientos previos sin columnas vs con columna.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio retrospectivo desde marzo de 2011 a mayo de 2013 incluyendo 21 casos a los que se les aplicó columnas de anexina V. De ellos se tomaron resultados de los 15 casos que tuvieron transferencia en fresco, cuyos gametos eran de la pareja y a los que se estudió la tasa de fecundación y tasa de embarazo.

La calidad embrionaria, al igual que la tasa de fecundación y de embarazo, fue evaluada comparando, en 10 parejas, los resultados obtenidos en

un ciclo previo de ICSI y un nuevo ciclo en el que se emplearon columnas de anexina V. Los espermatozoides fueron incubados con la proteína anexina V a la que se le había incorporado unas esferas metálicas, de manera que, al hacer pasar la muestra por un campo magnético, los espermatozoides apoptóticos y con ADN fragmentado quedarían atrapados en la columna.

#### RESULTADOS

De los 21 ciclos realizados, 15 tuvieron transferencia en fresco con una tasa de fecundación del 72.34% y una tasa de embarazo evolutivo del 53%. Al comparar tasa de fertilización, tasa de embarazo evolutivo y calidades embrionarias en pacientes con ciclos previos sin columnas vs columna obtuvimos: en los casos de fertilización nula, se consiguió una tasa de fertilización del 44.82% con un 7.69% de embriones tipo A y un 46.15% tipo B y una tasa de embarazo evolutivo del 100%. En el grupo de pacientes con baja fertilización y mala calidad embrionaria

se obtuvo una tasa de fecundación del 65.76% vs 75.9% pasando de un 6.84% a un 12.19% embriones tipo A y de 8.22% a un 21.95% embriones tipo B. En este grupo, la tasa de embarazo evolutivo en columnas fue del 37.5%.

#### CONCLUSIONES

La separación espermática magnética es un método no invasivo que puede optimizar los resultados de TRA mejorando la tasa de fecundación,

la calidad embrionaria y la tasa de embarazo en pacientes con ciclos fallidos de ICSI.

## P-174: CALIDAD EMBRIONARIA EN FUNCIÓN DE LA TÉCNICA DE FECUNDACIÓN (FIV CONVENCIONAL O ICSI) UTILIZADA

B. González Soto <sup>1</sup>, ML. Rivera <sup>2</sup>, E. Tejedor <sup>3</sup>, A.B. Rodríguez <sup>1</sup>, A. Muñoz <sup>1</sup>, M. García-Yuste, E. Mancha <sup>1</sup>, Y. Pascual <sup>1</sup>, A. Mazariegos <sup>1</sup>, F. Vazquez <sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Unidad de Reproducción. Servicio de Ginecología y Obstetricia. Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid. <sup>2</sup>Servicio de Análisis Clínicos y Bioquímica Clínica. Hospital Universitario de Salamanca. <sup>3</sup>Bioquímica Clínica. Servicios Centrales. Hospital Universitario Vall d'Hebron. Barcelona  
[beukasoto@gmail.com](mailto:beukasoto@gmail.com)

#### INTRODUCCIÓN

Existen dos técnicas principales en Reproducción Asistida utilizadas para lograr la fecundación: la fecundación in vitro (FIV) convencional y la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). En la FIV los espermatozoides previamente capacitados son depositados junto con los ovocitos con el objetivo de conseguir una fecundación lo más similar posible a la natural. En la ICSI los espermatozoides capacitados son introducidos mediante micromanipulación en los ovocitos maduros de la paciente. Ambas técnicas se aplican dependiendo de multitud de factores tanto masculinos como femeninos.

#### OBJETIVO

Analizar la calidad de los embriones obtenidos mediante FIV convencional con los obtenidos mediante ICSI, para estudiar el impacto del procedimiento de microinyección espermática de ovocitos en la calidad embrionaria obtenida.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudió el desarrollo preimplantacional de un total de 628 embriones humanos en un programa de FIV/ICSI en el Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid. La técnica de fecundación (FIV convencional o ICSI) se decidió en base a las características del semen. Se dividieron los embriones

en dos grupos, aquellos obtenidos mediante FIV convencional (n = 100), y embriones obtenidos mediante ICSI (n = 528). Segundo, se compararon las calidades de los embriones clasificándolas en 4 categorías: tipo A, B C o D (de acuerdo con la clasificación ASEBIR), tanto en la técnica de FIV convencional como mediante ICSI.

#### RESULTADOS

Mediante el test de Kolmogorov-Smirnov se determinó que la muestra sigue una distribución no-normal ( $p < 0.000$ ). Para nuestro estudio hemos utilizado un test estadístico Chi-cuadrado, encontrando diferencias significativas al comparar las técnicas de FIV e ICSI tanto a nivel global ( $P = 0.006$ ) teniendo en cuenta el número total de embriones, como segmentando los embriones en 4 categorías en base a su calidad: A, B, C y D. Hemos observado mediante el estudio de tablas de contingencia que es en la técnica de ICSI en la que se observan embriones de mejor calidad A+B (56%) frente a FIV (36%). Además en el estudio de nuestra población, mediante la técnica de FIV se obtiene un 48% de embriones de calidad comprometida D frente a un 28% de embriones D utilizando ICSI.

#### CONCLUSIONES

Este estudio indica que el desarrollo preimplantatorio, demostrado por el porcentaje de formación de embriones de buena calidad (tipo A

+ tipo B) es estadísticamente menor en los embriones obtenidos por FIV que por ICSI. Esto demuestra que las condiciones técnicas del procedimiento de ICSI no suponen una peor calidad embrionaria, como algunos autores postulan, por lo que esta técnica puede llevarse a cabo con total seguridad, siempre que el embriólogo que realiza el procedimiento tenga suficiente experiencia en la manipulación de los gametos.

## PRINCIPAL PATROCINADOR



## OTROS PATROCINADORES



## CONGRESO AUSPICIADO POR



Sociedad Española de Contracepción (SEC)

Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva (ASESA)

Sociedad Española de Fertilidad (S.E.F.)

Asociación Española de Biotecnología Médica (AEBM)

La Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO)

# ASEBIR

asebir@asebir.com | www.asebir.com

REVISTA DE EMBRIOLOGÍA CLÍNICA Y BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN



## VII CONGRESO

SEVILLA 2013 CENTRO DE CONVENCIONES GRAN SEVILLA

20-22  
NOVIEMBRE