ASEBIR

EMBRIOLOGÍA CLÍNICA Y BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

Noviembre 2017 **VOL. 22 Nº 2**

10 PROGRAMA CIENTÍFICO CONGRESO ASEBIR
20 SESIÓN DE ANDROLOGÍA
30 SESIÓN DE EMBRIOLOGÍA
43 SESIÓN DE CRIOBIOLOGÍA
49 EXPOSICIÓN PREMIOS EMB-ASEBIR 2015
61 SESIÓN DE GENÉTICA
66 SESIÓN DE CALIDAD
68 COMUNICACIONES ORALES
114 COMUNICACIONES PÓSTER

Imagen portada:
Gráfica IX Congreso ASEBIR

ÍNDICE

ASEBIR

SUMARIO

SUMARIO

BIENVENIDA 6
Yolanda Mínguez y Montse Boada

PROGRAMA CIENTÍFICO CONGRESO ASEBIR ... 11

SESIÓN DE ANDROLOGÍA 21
Contaminación ambiental en el factor masculino
Benedicte Jaquemin

Proteómica del espermatozoide
Rafael Oliva

SESIÓN DE EMBRIOLOGÍA 31
After 25 years of performing icsi, can we still improve the technique?
Joe Conaghan

MicroRNAs y reproducción.
Un nuevo horizonte molecular
Juan Manuel Moreno

Aplicación actual de los diferentes sistemas de Time Lapse
Natalia Basile

Metabolomics, proteomics and DNA mitochondrial in the Embryo selection
Thomas Ebner

SESIÓN DE CRIOBIOLOGÍA 43
Vitrificación de espermatozoides humanos
Raúl Segundo Sánchez

EXPOSICIÓN PREMIOS EMB-ASEBIR 2015 49
Vitrificación vs congelación. Estudio celular e inicios de la aplicación clínica
Llanos Medrano

Diagnóstico genético preimplantacional mediante secuenciación masiva, combinando detección de aneuploidías y trastornos monogénicos
Luis A. Alcaraz

SESIÓN DE GENÉTICA 61
La técnica CRISPR: aplicaciones y limitaciones
Lluís Montoliú

Clinical application of pronuclear transfer to prevent mitochondrial dna disease
Louise Hyslop

SESIÓN CALIDAD 66
Improving the safety and efficiency of the human reproduction laboratory
Paola Viganò

COMUNICACIONES ORALES 68

COMUNICACIONES PÓSTER 115

Noviembre 2017 Vol. 22 N°2

EDITA
Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción

EDITORES Y DIRECTORES CIENTÍFICOS
Mª Dolores Lozano Arana. HU Virgen del Rocío- Sevilla
Inmaculada Campos Ramírez. IVI Almería-Almería

COMITÉ EDITORIAL

Presidente:
Montserrat Boada Palá. Institut Universitari Dexeus- Barcelona

Vicepresidenta:
Mª José Torelló Ibañez . Hospital Quirón Barcelona-Barcelona

Secretaría y RRPP:
Anna Serra Peruchet. IBILAB-Illes Baleares

Tesorería:
Josep Santaló Pedro. Universidad Autónoma de Barcelona-Bellaterra

Patrocinios:
Aranzazu Galán Rivas. IVI Valencia-Valencia

Vocalía de Grupos de interés e investigación:
Laura Marqués Soler. Centre de Reproducio Asistida, Clínica Sagrada Familia-Barcelona

Vocalía de Publicaciones y Congresos
Mª Dolores Lozano Arana. HU Virgen del Rocío- Sevilla
Inmaculada Campos Ramírez. IVI Almería-Almería

Vocalía de Docencia y Formación
Francisco Javier Vendrell Montón. Sistemas genómicos S.L., Sueca-Valencia
José Luis de Pablo Franco. ART Vitoria, Vitoria.

Vocalía Tecnología de la información y comunicación
Abel Gayo Lana. FIV4-Instituto de Reproducción Asturiano, Oviedo
Enrique Olaya Vila. IVF Spain, Alicante.

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

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

DISEÑO Y MAQUETACIÓN
Góbalo, Agencia Creativa Digital
C/ Castillo de Fuensaldaña 4 · 28232 Las Rozas, Madrid
Tfno.: 91 626 39 74 · www.gobalo.es · hola@gobalo.es
Depósito legal: M-18873-1996 | ISSN: 1136-4424
Soporte válido: 78-R-CM

IX congreso ASEBIR MAD 2017

15-17 Noviembre, Madrid

Centro de convenciones Hotel Meliá Castilla

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

Estimados/as Compañeros/as:

En nombre de los Comités Científico y Organizador, y de la Junta Directiva de ASEBIR, es un placer poder daros la bienvenida al IX Congreso ASEBIR.

Han sido dos años de trabajo intenso dirigido a organizar un evento científico que esté a la altura de ASEBIR, sociedad en alza que ya cuenta con más de 1000 asociados y que cada día tiene más peso en nuestro país y también en el ámbito internacional. Con el fin de seguir ampliando fronteras y propiciar la proyección internacional de nuestra sociedad, en este congreso encontrareis distintos cursos, ponencias y simposios que se impartirán en inglés.

Deseamos que disfrutéis de Madrid, una ciudad que siempre se muestra abierta y acogedora con sus visitantes. Que aprovechéis para reencontraros con los compañeros que solo veis de Congreso en Congreso y que el entorno os resulte propicio para entablar relaciones de colaboración profesional, y sobre todo esperamos que disfrutéis y saquéis provecho del alto nivel del programa científico, de los cinco Simposios Satélites y los cursos pre-congreso que ponemos a vuestra disposición.

No queremos dejar pasar la ocasión para agradecer a las casas comerciales su alto nivel de implicación y colaboración sin el que sería muy difícil organizar un Congreso como este.

Confiamos en que disfrutéis mucho durante vuestra estancia entre nosotros

¡Bienvenidos a MAD 2017!

Yolanda Mínguez
Presidenta Comité Organizador

Montserrat Boada Palà
Presidenta de ASEBIR 2013-2017

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

IX congreso ASEBIR MAD 2017

15-17 Noviembre, Madrid

Centro de convenciones Hotel Meliá Castilla

COMITÉ DE HONOR

Excma. Sra. Dª. Dolors Montserrat Montserrat
Ministra de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad

Excma. Sra. Dª. Cristina Cifuentes Cuencas
Presidenta de la Comunidad de Madrid

Dr. D. Jesús Sánchez Martos
Consejero de Sanidad de la Comunidad de Madrid

Sr. Rector Magfco. D. Carlos Andradas Heranz
Universidad Complutense de Madrid

Sr. Rector Magfco. D. Juan Fernando Galván Reula
Universidad de Alcalá
Alcalá de Henares, Madrid

Sr. Rector Magfco. D. Rafael Garesse Alarcón
Universidad Autónoma de Madrid

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

COMITÉ ORGANIZADOR LOCAL

PRESIDENTE

Yolanda Mínguez Royo

VOCALES

Antonio Alcaide Raya
Manuel Ardoy Vilches
Iñaki Arroyos Solaguren
José Luis de Pablo Franco
Elisa Escalante Bermúdez
Carolina González Varea
Miriam Iglesias Núñez
Fernando Jesús Prados Mondéjar
Sara Rafael Fernández
Félix Rodríguez Juárez
Luz Rodríguez Ramírez
Mª José Torello Ybáñez
Celia Villas Martín

COMITÉ CIENTÍFICO

PRESIDENTE

Yolanda Mínguez Royo

VOCALES

Vicente Badajoz Liébana
Montserrat Boada Palá
Yolanda Cabello Vives
Inmaculada Campos Ramírez
Jorge Cuadros Fernández
Cristina González Ravina
Mark Grossmann i Camps
Mª Victoria Hurtado de Mendoza y Acosta
Mª Dolores Lozano Arana
José Muñoz Ramírez
Rocío Núñez Calonge
Nereida Ortiz Piñate
Xavier Vendrell Montón

GRUPO PROCESS SMART EVENT

SECRETARÍA TÉCNICA GRUPO PROCESS
C/ Cronos, 20, Bloque 4, 1º, 6ª - Madrid 28037
Telf.: +34 91 377 14 23/ Fax: +34 91 377 49 65
E-mail: info@congresoasebir.es

CRÉDITOS

Actividad docente (nº de expediente 07-AFOC- 02731.2/2017) acreditada por la Comisión de Formación Continuada de las Profesiones Sanitarias de la Comunidad de Madrid-Sistema Nacional de Salud con 0,7 créditos de formación continuada.

AUSPICIADO POR

Sociedad Española de Contracepción (SEC)

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

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

Colegio Oficial de Biólogos de la Comunidad de Madrid (COBCM)

PRINCIPALES PATROCINADORES

EMB GRUPO

origio

MERCK

OTROS PATROCINADORES

BioCare Europe part of Irvine Scientific

BA BIOARRAY

concile innovation meets diagnostics

CONTROLTECNICA Instruments

COOK MEDICAL

Durviz Diagnóstico e investigación

FERRING PRODUCTOS FARMACEUTICOS

fertibank

Geniality diagnóstico genético

halotech

igenomix PIONEERS IN REPRODUCTIVE GENETICS

illumina

ilitia

KITAZATO

MACS Miltenyi Biotec

nexus | sisinf

OLYMPUS

Oosafe®

QUERMED

qgenomics

sistemas genómicos

ThermoFisher SCIENTIFIC

VITROMED Germany

VRepro Software para reproducir el ciclo de la vida

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

PROGRAMA CIENTÍTICO

MIÉRCOLES, 15 DE NOVIEMBRE DE 2017

15:00 - 15:30 hrs. Inauguración

15:30 - 16:30 hrs. SESIÓN 1 – Andrología

Moderadores Presidenta GI de Andrología: Cristina González, IVI Sevilla, Sevilla y Manuel Ardoy, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid

Contaminación ambiental en el factor masculino

Ponente: Benedicte Jaquemin, ISGlobal-Creal, Barcelona

Proteómica del espermatozoide

Ponente: Rafael Oliva Virgili, Universitat de Barcelona, Unidad de Genética, Facultat de Medicina, Barcelona

16:30 - 17:30 hrs. Simposio ILLUMINA: New insights on clinical use of preimplantation genetic screening and cell-free DNA testing in pregnancy
NGS-based preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) for single embryo transfer

Speaker: Alan Handyside - Principal Scientist, Reproductive and Genetic Health Product Marketing Dep

Aneuploidy screening by noninvasive prenatal testing (NIPT): Advantages and counseling considerations

Speaker: Kristin Dalton - Sr Genetic Counselor.

17:30 - 18:00 hrs. Pausa

18:00 - 19:10 hrs. Comunicaciones Andrología

Moderadores: Jorge Cuadros, FIV-Madrid, Madrid y Elisa Escalante, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

18:00 – 18:10 hrs. CO-01 - Estudio comparativo de fluido folicular y del plasma seminal III: preservación de la calidad del espermatozoide

M. Dorado Silva [1], C. Torrado García [1], M. González Martínez [2], J. Bartolomé Nebreda [3], P. Sánchez Martín [2], J. Gosálvez Berenguer [3]

[1] GINEMED Huelva, [2] Ginemed Sevilla, [3] Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid

18:10 – 18:20 hrs. CO-02 - Evaluación de la técnica de lavado seminal para la eliminación De virus zika en eyaculado

M. Guimerà Leal, A. Peiró Mestres, M. Dalmau Quera, S. Cívico Vallejos, V. Gonzalo Abril, G.Casals Soler, V. Moreno Folch, JM. Calafell Pozo, E. Vidal Sordé, MJ. Martínez Yoldi HOSPITAL CLÍNIC, Barcelona

18:20 – 18:30 hrs. CO-03 - Niveles de marcadores apoptóticos en suero y líquido seminal en varones con alteraciones espermáticas

M R. Núñez Calonge [1], S. Cortés Gallego [1], L. Ortega López [1], LM. Gutiérrez González [2], R. Kireev [3] [1] Clínica Tambre, Madrid, [2] Universidad Alfonso X el Sabio, Madrid, España, [3]

Instituto de Investigación Sanitaria Galicia Sur, Vigo, España

18:30 – 18:40 hrs. CO-04 - Efecto de la exposición a disruptores endocrinos sobre la calidad espermática y la tasa de aneuploidas en donantes de semen

I Campos Galindo [(1)], F Domínguez Hernández [(2)], R Rivera Egea [(3),] N Garrido Puchalt [(2)], V Peinado Cervera [(1)], C Simón Vallés [(4)], C Rubio Lluesa [(1)]

[(1)] IGENOMIX Spain, Paterna, Valencia, [(2)] Fundación IVI, Valencia, España, [(3)] IVI Valencia, Valencia, España, (4) Obs/Gyn Dept., Valencia University/INCLIVA; Igenomix; Ob/Gyn Dept., Stanford University; Ob/Gyn Dept., Baylor College of Medicine, Valencia, Spain

18:40 – 18:50 hrs. CO-05 - Caracterización de la carga de prostasomas presente en el plasma seminal de muestras normozoospérmicas vs patológicas

A. García Rodríguez [(1)], M. de la Casa [(2)], MI. Pacheco [(3)], J. Gosálvez [(1)], H. Peinado. [(4)], D. Olmos [(5)], R. Roy [(1)]

[(1)] Universidad Autónoma de Madrid, [(2)] Clínica GINEFIV, Madrid, [(3)] Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas. Unidad de Investigación en Cáncer de Próstata, Madrid, [(4)] Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas. Departamento de Oncología Molecular. Laboratorio de Microambiente y Metástasis, Madrid, [(5)] Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas. Unidad de Investigación en Cáncer de Próstata. Madrid

18:50 - 19:00 hrs. CO-06 - Valoración del area media de la cabeza espermática como posible indicador para solicitar fish en espermatozoides

J. Bataller Sánchez [(1)], A. Barberá Alberola [(1)], X. Vendrell ontón [(2)], M. Ruiz Jorro [(1)], C. Calatayud Lliso [(1)].

[(1)] CREA. Centro Médico de Reproducción Asistida, Valencia, [(2)] Sistemas Genómicos, Paterna, Valencia

19:00 - 19:10 hrs. CO-07 - Validación de un nuevo método de detección de roturas de doble cadena de adn espermático mediante el marcado de gamma-h2ax y el análisis con microscopía de epifluorescencia

M. Ruiz Jorro, JJ. Bataller, E. Berenguer, A. Barberá, C. Calatayud CREA - Medicina de la Reproducción, Valencia

19:10 - 20:10 hrs. Simposio GRUPO EMB: Improve workflow efficiency and maximize clinical outcomes in your IVF clinic

Chairman: Vicente Badajoz, Ginefiv, Madrid, Spain

The evolution of time-lapse in clinical embryology: from imaging to an embryological working concept

Speaker: Dr Markus Montag, ilabcomm GmbH, Germany

How to save time and secure good results in vitrification

Speaker: Dr. Jaco Geyer, Vitrolife Sweden AB, Sweden

Trophectoderm biopsy by Vitrolife: tools and procedures

Speaker: Dra. Victoria Sánchez, Vitrolife- MTG, Germany

20:10 hrs. Cocktail Inaugural

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

JUEVES, 16 DE NOVIEMBRE DE 2017

08:30 - 9:30 hrs. SESIÓN 2 – Embriología 1

Moderadores: Presidenta GI de Embriología, Mª Victoria Hurtado de Mendoza, Caremujer-Quirón, Hospital QUIRON Sagrado Corazón, Sevilla y Fernando J. Prados, Hospital Universitario Madrid Montepríncipe, Boadilla del Monte, Madrid.

After 25 years of performing ICSI, can we still improve the technique?

Ponente: Joe Conaghan, Pacific Fertility Center. San Francisco, CA, USA

MicroRNAs y reproducción. Un nuevo horizonte molecular

Ponente: Juan Manuel Moreno Moya, Oslo University Hospital, Oslo, Norwegian

Debate

09:30 – 10:30 hrs. Comunicaciones Embriología 1

Moderadores: Mª Dolores Lozano, Hospital Virgen del Rocío, Sevilla y Celia Villas, URH García del Real, Madrid

09:30 – 09:40 hrs. CO-08 - Modelos predictivos de calidad embrionaria mediante el uso resonancia magnetica nuclear

MA. Vilches Ferron [(1)], AC. Abreu [(2)], FM. Arrabal Campos [(2)], LM. Aguilera Saez [(2)], I. Fernández de las Nieves [(2)].

[(1)] Complejo Hospitalario Torrecardenas, Almería.

[(2)] Universidad de Almería, Almería

09:40 – 09:50 hrs. CO-09 - Marcadores subcelulares de maduración citoplasmática en ovocitos humanos

A. Ferrer Vaquer, M. Barragán Monasterio, AM. Nicolau, A. Rodríguez Aranda, R. Vassena Clínica EUGIN, Barcelona

09:50 – 10:00 hrs. CO-10 - Estudio de casos y controles anidados en una cohorte de gestaciones clínicas conseguidas mediante técnicas de reproducción asistida: evaluación de salud de 440 niños al año y 3 años de edad

MJ. Sánchez Soler [(1)], V. López González [(2)], MJ. Ballesta Martínez [(2)], M. Nicolás Arnao [(3)], J. Sánchez [(4)], M. Pérez Izquierdo [(5)], L. Sarabia Cos [(6)], E. Gómez Sánchez [(7)], V. Pérez Fernández [(8)], E. Guillén Navarro [(9)]

[(1)] Sección de Genética Médica, H. Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, [(2)] Sección de Genética Médica, Servicio de Pediatría, H. Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, IMIB-Arrixaca- Murcia CIBERER-ISCIII- Madrid , [(3)] Sección Ginecología. Clínica IVI, Murcia, [(4)] Laboratorio de FIV y Andrología. Instituto Murciano de Fertilidad (IMFER), [(5)] Instituto Bernabeu-Centro de Reproducción Asistida, Murcia (IB), [(6)] Laboratorio de FIV. Centro de Reproducción Asistida Quirónsalud Dexeus, [(7)] Director Biología de la Reproducción. Tahe Fertilidad, Murcia, [(8)] Servicio de Estadística, Universidad de Murcia, [(9)] IMIB-Arrixaca- Murcia CIBERER-ISCIII- Madrid

10:00 – 10:10 hrs. CO-11 - efecto de la adición de quercetina en los medios de cultivo de fecundación in vitro (fiv): desarrollo embrionario y expresión del factor inducible por hipoxia-1α (hif-1α)

N Hernández Rollán, C Tobajas Vega, E Matilla Pinto, J Mijares Gordún, FM Sánchez Margallo, IS Álvarez Miguel, B Mácias García Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, Cáceres

10:10 – 10:20 hrs. CO-12 - Una única observación en d5 es suficiente

para evaluar los embriones en un programa de ovodonación: resultados finales de un ensayo controlado aleatorio prospectivo y doble ciego

J. Ten Morro, J Guerrero Villena, A. Rodríguez Arnedo, B. Moliner Renau, J. Llácer Aparicio, R. Bernabeu Pérez Instituto Bernabeu, Alicante

10:20 – 10:30 hrs. CO-13 - Preliminary results on exploring the in vitro outcome of unipronuclear embryos

N. Grau Grau [(1)], N. Soler Balaguer [(1)], C. Climent Grau [(1)], L. Escrich Albelda [(1)], D. Beltrán Torregrosa [(1)], A. Tejera Pastor [(1)], P. Buendía Segura [(1)], R. Tena Ros [(2)], X. Vendrell Montón [(2)], MJ. Escribá Pérez [(1)]

[(1)] IVI-Valencia, Valencia, [(2)] Sistemas Genómicos, Paterna, Valencia

10:30 - 11:00 hrs. Coffee break

11:00 - 12:00 hrs. SESIÓN 2 – Embriología 2: Nuevas tecnologías y selección embrionaria

Moderadores: Rocío Núñez, Clínica Tambre, Madrid y Carolina González, Hospital Universitario La Paz, Madrid.

Aplicación actual de los diferentes sistemas de Time Lapse

Ponente: Natalia Basile, Instituto Valenciano de Infertilidad, Madrid

Metabolomics, proteomics and DNA mitocodrial in the embryo selection

Ponente: Thomas Ebner, Kepler Universitätsklinikum GmbH. Austria

Debate

12:00 – 13:00 hrs. Comunicaciones Embriología 2

Moderadores: Inmaculada Campos, IVI Almería, Almería, y Enrique Olaya, IVF Spain, Alicante

12:00 – 12:10 hrs. CO-14 - Primeros embarazos y nacimientos tras el cultivo embrionario en temperatura fisiológica variable

I. Cuevas Saiz, S. Arrones Olmo, I. Martínez Rodero, A. Genovés Pérez, C. Olmedo Illueca, S. Royo Bolea, L. Abad de Velasco, A. Morales Vicente, M. Barea Gómez

Hospital General Universitario de Valencia, Valencia

12:10 – 12:20 hrs. CO-15 - Cleavage orientation in the early human embryo: considering the perivitelline space and the zona pellucida (zp)

PA. Martin Bastida, L. Kellam, J. Graves, A. Campbell, S. Fishel CARE Fertility, Nottingham, Nottinghamshire, Reino Unido

12:20 – 12:30 hrs. CO-16 - Efecto de la melatonina sobre el estado oxidativo del líquido folicular y su efecto en los tratamientos de fertilidad

A. Ortiz Ruiz [(1)], G. Lozano Cordero [(1)], M. Macedo Morales [(1)], M. Márquez Pérez [(1)], F. Monllor Nácher [(1)], C. Rodríguez Moratino [(1)], J. Espino Palma [(2)], I. Bejarano Hernado [(2)]

[(1)] Centro Extremeño de Reproducción Humana Asistida, Badajoz, [(2)] Universidad Extremadura

12:30 – 12:40 hrs. CO-17 - la transferencia de huso meiótico mejora el desarrollo embrionario de ovocitos con potencial limitado: prueba de concepto en el modelo murino

E. Mestres Gonzalvo [(1)], R. Balmaseda Casabó [(2)], I. Miguel Escalada [(3)], M. Garcia Jiménez [(1)], I. Vanrell Barbat [(1)], J. González Jiménez [(2)], J. Palacios Sánchez [(2)], G. Calderón de Oya [(1)], N. Costa Borges [(1)]

[(1)] Embryotools, R&D Center, Barcelona, [(2)] PCB-PRBB. Animal Facility Alliance, Barcelona, [(3)] IDIBAPS. Genomic-programming laboratory, Barcelona

12:40 – 12:50 hrs. CO-18 - Importancia del medio de cultivo en el timing

embrionario: medios secuenciales vs medio único

P. Muñoz Soriano, V. Antequera Durán, E. Ferrer Robles, C. Calatayud Lliso, M. Ruiz Jorro CREA, Valencia

12:50 – 13:00 hrs. CO-19 - Calidad ovocitaria: maduración in vitro ¿antes o después de la vitrificación?

Y. Segovia Huertas [(1)], N. Victory [(1)], I. Peinado [(2)], LM. Garcia-Valverde [(3)], M. Garcia [(1)], J. Aizpurua [(4)], A. Monzó [(2)], MJ. Gómez-Torres [(5)].

[(1)] Departamento de Biotecnología, Universidad de Alicante, Alicante, España, [(2)] Unidad de Reproducción Humana, Hospital La Fe, Valencia, Spain, [(3)] IVF Spain,Reproductve Medicine, Alicante, España, [(4)] IVF Spain, Reproductve Medicine,Alicante, España; Cátedra Human Fertility, Universidad de Alicante, Alicante,España, [(5)] Departamento de Biotecnología, Universidad de Alicante; Cátedra Human Fertility, Universidad de Alicante, Alicante, España

13:00 – 14:00 hrs. Simposio. MERCK: "Creando vida juntos..."

Modera: Dra. Rocío Núñez Calonge – Subdirectora. Directora Científica. Clínica Tambre, Madrid

La tecnología al servicio de la vida

Ponente: Dra. Rocío Núñez Calonge – Subdirectora. Directora Científica. Clínica Tambre, Madrid

La vida, cuestión de confianza

Ponente: Dr. Yosu Franco Iriarte - Director Gerente. IVF Donostia, San Sebastián

La tecnología presente, la vida futura

Ponente: Dr. Miquel Solé Inarejos - Responsable del Laboratorio de Criopreservación. Dexeus Mujer, Barcelona

La vida desde el comienzo

Ponente: Dr. Antonio Urries López - Director de Reproducción Asistida Quirónsalud Zaragoza, Zaragoza

14:00 - 15:00 hrs. Almuerzo

15:00 - 16:00 hrs. Simposio BIOARRAY - THERMO FISHER SCIENTIFIC: Avances en genética reproductiva

Presentador: Dr. Luis A. Alcaráz

Indicadores genéticos de selección embrionaria: DGP-A, DNAmit, blastocentesis, etc. ¿Son realmente aplicables y útiles?

Ponente: Miguel Ángel Fernández Pérez, Embriólogo Clínico Sénior, Director Área Reproducción, BIOARRAY

New solutions for high throughput mosaic in preimplantation analysis

Speaker: Alain Rico, Business Development Manager, Reproductive Health, Thermo Fisher Scientific

16:00 - 17:00 hrs. Sesión 3 - Criobiología

Moderadores: Presidente GI de Criobiología, Mark Grossmann, Barcelona IVF, Barcelona y Mª José Torello, Hospital QuirónSalud Barcelona, Barcelona.

Vitrificación de espermatozoides

Ponente: Raúl Segundo Sánchez Gutiérrez, Universidad de La Frontera, Temuco,CHILE

17:00 – 17:30 hrs. Pausa

17:30 – 18:40 hrs. Comunicaciones Criobilogía

Moderadores: Abel Gayo, FIV4 - Instituto de Reproducción Humana, Oviedo y Miriam Iglesias, Hospital Universitario Quirónsalud Madrid, Pozuelo de Alarcón, Madrid

17:30 – 17:40 hrs. CO-20 - Resultados reproductivos utilizando un sistema de vitrificacion de ovocitos cerrado versus un sistema abiertoó

A. Pujol Massana, MJ. Zamora Berlanga, A. Obradors Cherta, D. García García, A. Rodríguez Aranda, R. Vassena Clínica EUGIN, Barcelona

17:40 – 17:50 hrs. CO-21 - Primeros embarazos con ovocitos criopreservados con un sistema de vitrificación automatizado

M. Solé Inarejos, M. Boada Palà, C. De la Cruz Rodrigo, E. Clua Obrado, A. Veiga Lluch, B. Coroleu Lletget. Hospital Universitari Dexeus, Barcelona

17:50 – 18:00 hrs. CO-22 - Efecto del grado de reexpansión de blastocistos desvitrificados en las tasas de embarzo

S. Novo Bruña, C. Castelló Zupac, A. Rodríguez Isern, J. Massó Hernáez, M. Asensio Paños, M. López-Teijón. Instituto Marques, Barcelona

18:00 – 18:10 hrs. CO-23 - El análisis de blastocistos desvitrificados por morfología dinámica con monitorización continua permite definir nuevas variables cuantitativas relacionadas con la implantación

A. Coello Perles, A. Cobo Cabal, A. Galán Rivas, L. Alegre Ferri, M. Nohales Corcoles, M. Meseguer Escrivá. IVI Valencia, Valencia

18:10 - 18:20 hrs. CO-24 Comparación de dos métodos de vitrificación (cryotip y cryotop) en transferencias de embriones de día 3 y blastocisto

A. Martí Alemany, I. Iniesta Mirón, I. Peinado Casas, JV. Martínez Sanchis, J. Subirá Nadal, JM. Rubio Rubio Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia

18:20 -18:30 hrs. CO-25 Transferencia en fresco vs transferencia diferida

S. Tabar Roquet, M. Rius Mas, I. Boiso Fedorovsky, C. Mangrané Brasa, A. Martí Ralda, M. Martín Gallardo, J. Herrero García, L. Marquès Soler Centro Reproducción Asistida Clínica Sagrada Familia, Barcelona

18:30 – 18:40 hrs. CO-26 Comparación de los parámetros espermáticos tras la congelación lenta y la vitrificación de espermatozoides

A. Genovés Pérez [(1)], I. Martínez Rodero [(1)], S. Arrones Olmo [(1)], C. Olmedo Illueca [(1)], A. García Molina [(2)], M. Barea Gómez [(1)], S. Royo Bolea [(1)], L. Abad de Velasco [(1)], A. Morales Vicente [(1)], I. Cuevas Saiz [(1)]

[(1)] Hospital General Universitario de Valencia, Valencia [(2)] Proiser R+D, Paterna

18:40 - 19:00 hrs. Exposición premios EMB-ASEBIR 2015

Moderadores: Presidenta ASEBIR, Montserrat Boada, Salut de la Dona DEXEUS, Barcelona y Presidenta IX Congreso ASEBIR, Yolanda Mínguez, IVI Madrid, Madrid

Premio EMB ASEBIR 2015 de Investigación Básica: Vitrificación vs congelación. Estudio celular e inicios de la aplicación clínica.

Ponente: Llanos Medrano, IVF SPAIN, Alicante, España.
Autores: Llanos Medrano a,b,c, Maria Jose Gómez-Torres b,c, Andrea Leza a,b, Belén Ramos a,b, María Enciso d, Jonás Sarasa d, Jon Aizpurua a,b a IVF SPAIN, Alicante, España. b Cátedra Human Fertility, Universidad de Alicante, España. c. Departamento de Biotecnología, Universidad de Alicante, España. d IGLS, Alicante, España.

Premio EMB ASEBIR 2015 de Embriología Clínica: Diagnóstico genético preimplantacional mediante secuenciación masiva, combinando detección de aneuploidías y trastornos monogénicos.

Ponente: Luis A. Alcaraz, Bioarray, S.L. Elche (Alicante).
Autores: Luis A. Alcaraz, Vanessa Penacho, Santiago González-Reig, Natalia Castejón-Fernández, Francisco Galán, Diego Amorós, Helena Blanca, Leonardo Díaz, Miguel Fernández Bioarray, S.L., Elche (Alicante).

19:15 hrs. **Entrega del Premio ASEBIR al Mejor Póster 2017 y Premio CRIO Merck ASEBIR 2017**

VIERNES, 17 DE NOVIEMBRE DE 2017

08:30 - 09:30 hrs. SESIÓN 4 - Genética

Moderadores: Presidente GI de Genética, Xavier Vendrell, Sistemas Genómicos, Paterna, Valencia y José Muñoz, Madrid

La técnica CRISPR: aplicaciones y limitaciones

Ponente: Lluis Montoliú José, National Centre of Biotechnology (CNB-CSIC), Madrid

09:30 - 10:40 hrs. Comunicaciones Genética

Moderadores: Antonio Alcaide, Reprofiv, Alcorcón, Madrid y Luz Rodríguez, Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, Madrid.

09:30 - 09:40 hrs. CO-27 - Validación de un nuevo protocolo basado en secuenciación masiva para el dgp de reordenamientos cromosómicos estructurales y segmentos intracromosómicos: el dgp de alta resolución.

X. Vendrell Montón [(1)], V. Fernández-Pedrosa [(1)], JC. Triviño [(1)], R. Bautista-Llácer [(1)], C.Collado [(1)], O. Rodríguez [(1)], E. García-Mengual [(1)], M. Benavent [(2)], J. Pons [(2)], MC. Cañadas [(3)].

[(1)] Sistemas Genómicos, Paterna, Valencia [(2)] Ginemed, Valencia, [(3)] Genefiv, Madrid

09:40 – 09:50 hrs. CO-28 - Detección de mosaicismo cromosómico brionario mediante next-generation sequencing (ngs): influencia sobre la tasa de recién nacido vivo.

R. Morales Sabater, B. Lledó Bosch, JA. Ortiz Salcedo, J. Ten Morro, J. Llácer Aparicio, R. Bernabeu Pérez. Instituto BERNABEU, Alicante

09:50 – 10:00 hrs. CO-29 - Parámetros embrionarios que afectan a la tasa de aneuploidías de los blastocistos humanos

A. Delgado Mendive, A. Mercader Bayarri, L. Escrich Albelda, P. Buendía Segura, D. Beltrán Torregrosa, N. Grau Grau, F. Insua Piotti, MJ. De los Santos Molina IVI VALENCIA, Valencia

10:00 – 10:10 hrs. CO-30 - Herencia epigenética transgeneracional por vía paterna: la parte lamarckista del espermatozoide

[(1)] Genetics of Male Fertility Group, Unitat de Biologia Cel·lular (Facultat de Biociències), Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Cerdanyola del Vallés, Barcelona, [(2)] Sequentia Biotech, Edificio Eureka, Campus UAB, 08193- Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), [(3)] IVI Foundation, Parc Científic Universitat de València, 46980-Paterna, [(4)] GenIntegral, Barcelona/ Genetics of Male Fertility Group, Unitat de Biologia Cel·lular (Facultat de Biociències), Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra (Cerdanyola del Vallès)

10:10 – 10:20 hrs. CO-31 - Pre-conceptional oocyte diagnosis on fresh or cryopreserved oocytes

L. Escrich Albelda [(1)], Y. Galiana Briones [(2)], N. Grau Grau [(1)], N. Soler Balaguer [(1)], F. Insúa

Piotti [1], A. Mercader Bayarri [1], A. Delgado Mendibe [1], D. Castelló Salom [1], M. Nohales Corcoles [1], MJ. Escribá Pérez [1]

[1] IVI-Valencia, Valencia, [2] IVI-Bilbao, Bilbao

10:10 – 10:20 hrs. CO-32 - Análisis 3d de la territorialidad cromosómica en células espermatogénicas: explorando la infertilidad desde un nuevo prisma

M. Solé Canal [1], J. Blanco Rodríquez [1], D. Gil Resina [2], O. Valero Coppin [3], G. Fonseka [4], R. Frodsham [4], F. Vidal Domínguez [1], Z. Sarrate Navas [1]

[1] Genetics of Male Fertility Group. Unitat de Biologia Cel·lular. Universitat Autònoma de Barcelona. Cerdanyola del Vallès, Barcelona, [2] Centre de visió per computació. Departament de ciències de la computació. Universitat Autònoma de Barcelona. Cerdanyola del Vallès, España., [3] Servei d Estadística aplicada. Universitat Autònoma de Barcelona. Cerdanyola del Vallès, España., [4] Cytocell Ltd, Technopark, Newmarket Road, Cambridge CB5 8PB, UK.

10:30 – 10:40 hrs. CO-33 - Parejas estables de mirnas: nuevas perspectivas para encontrar biomarcadores de fertilidad masculina

C. Corral Vázquez, A. Salas Huetos, J. Blanco, F. Vidal, E. Antón Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola), Barcelona

10:40 - 11:00 hrs. Coffee Break

11:00 - 12:00 hrs. SESIÓN 4 - Genética 2

Moderadores: Josep Santaló, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona y Yolanda Cabello, Clínica Ruber, Madrid

Clinical application of pronuclear transfer to prevent mitochondrial DNA disease

Ponente: Louise Hyslop (Newcastle Fertility Centre, Newcastle upon Tyne NHS Foundation Trust. Wellcome Trust Centre for Mitochondrial Research, Newcastle University, UK)

12:00 - 14:00 hrs. Asamblea General Ordinaria ASEBIR

14:00 - 15:00 hrs. Almuerzo

15:00 - 16:00 hrs. Simposio ORIGIO: Nuevas Tecnologías y Avances en Reproducción Asistida

Chairman: Arancha Galán Rivas, Subdirectora Laboratorio FIV, IVI Valencia

An 8 year snapshot of insightful data using RI Witness™: an absolute necessity for your IVF laboratory

Speaker: Dr. Stephen Troup, Scientific Director, IVI UK

PGS and the Embryology lab - Biopsy and Beyond

Speaker: Dra. Colleen Lynch , Laboratory Manager, Cooper Genomics, Denmark

16:00 - 17:40 hrs. SESIÓN 5 - Calidad

Moderadores: Presidenta GI de Calidad, Nereyda Ortiz, Instituto Europeo de Fertilidad, Madrid y José Luis de Pablo, Clínica ART Vitoria, Vitoria-Gasteiz.

Improving the safety and efficiency of the human reproduction laboratory

Ponente: Paola Viganò, IRCC Ospedale San Raffaele, Milan, Italy

17:00 - 18:00 hrs. Comunicaciones Calidad

Moderadores, Laura Marqués, Clínica Sagrada Familia, Barcelona y Sara Rafael, Hospital Clínico San Carlos, Madrid

17:00 – 17:10 hrs. CO-34 - Efecto de los compuestos orgánicos volátiles (covs) sobre el desarrollo de los pre-embriones humanos

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

V. Vásquez Cubillos [(1)], D. Beltrán Torregosa [(1)], C. Rubio Lluesa [(2)], L. Rodrigo Vivó [(2)], A. Mercader Bayarri [(1)], A. Tejera Pastor [(1)], MJ. De los Santos Molina [(1)]

[(1)] IVI Valencia, Valencia [(2)] Igenomix, Paterna, Valencia

17:10 – 17:20 hrs. CO-35 - Efecto de la calidad del aire atmosférico en la fecundación y desarrollo embrionario in vitro

S. Novo Bruña, C. Castelló Zupac, M. Solans Pomares, A. Farreras Ayestarán, JM. Capdevila Vilana, M. López-Teijón. Instituto Marques, Barcelona

17:20 – 17:30 hrs. CO-36 - ¿En qué características morfológicas de embriones tempranos difieren centros y expertos?

L. Martínez Granados [(1)], M. Serrano Molina [(2)], A. González Utor [(3)], N. Ortíz Piñate [(4)], ML. López Regalado [(1)], V. Badajoz Liébana [(5)], L. Marqués [(6)], H.Gutiérrez Rodríguez [(1)], A. Moral Fernández [(1)], JA. Castilla Alcalá [(7)]

[(1)] Unidad de Reproducción Humana. UGC Laboratorio Clínico y UGC Obstetricia y Ginecología, HU Virgen de las Nieves. Granada, [(2)] Clínica IFEM, Córdoba, España , [(3)] MasVida Reproducción, Sevilla, España, [(4)] Instituto Europeo de Fertilidad, Madrid, España., [(5)] GINEFIV, Madrid, España, [(6)] CRA Clínica Sagrada Familia, Barcelona, España., [(7)] CEIFER biobanco, Granada, España.

17:30 – 17:40 hrs. CO-37 - Resultado de la variable ¿estadio específico? de la clasificación embrionaria de asebir 2015 en el programa de control de calidad externo de morfología embrionaria

L. Martínez Granados [(1)], M. Serrano Molina [(2)], A. González Utor (3), N. Ortíz Piñate [(4)], ML. López Regalado [(1)], V. Badajoz Liébana [(5)], P. Navas Bastida [(1)], M. Navarrete Carmona [(1)], M. Canales Gijón [(1)], JA. Castilla Alcalá [(6)]

[(1)] Unidad de Reproducción Humana. UGC Laboratorio Clínico y UGC Obstetricia y Ginecología, HU Virgen de las Nieves. Granada, [(2)] Clínica IFEM, Córdoba, España, [(3)] MasVida Reproducción, Sevilla, España, [(4)] Instituto Europeo de Fertilidad, Madrid, España, [(5)] GINEFIV, Madrid, España, [(6)] CEIFER biobanco, Granada, España.

17:40 – 17:50 hrs. CO-38 - Análisis modal de fallos y sus efectos en la fase pretécnica del laboratorio de reproducción asistida

I. Molina González [(1)], A. Clavero Gilabert [(2)], M. Gonzalvo López [(2)], M. López Regalado [(2)], M. Navarrete Carmona [(2)], H. Gutierrez Rodríguez [(2)], M. Canales Gijón [(2)], A. Moral Fernández [(2)], P. Navas Bastida , JA. Castilla Alcalá [(3)]

[(1)] Hospital Universitario Río Hortega (HURH).Valladolid, [(2)] Unidad de Reproducción Humana. UGC Laboratorio Clínico y UGC Obstetricia y Ginecología, HU Virgen de las Nieves, Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (IBS), Granada, Spain, [(3)] Ceifer Biobanco, Granada.

17:50 - 18:00 hrs. CO-39 - Como afectan los compuestos orgánicos volátiles (covs) al recuento de adn mitocondrial de pre-embriones humanos.

D. Beltran Torregrosa [(1)], V. Vàsques Cubillos [(1)], C. Rubio Iluesa [(2)], L. Rodrigo Vivó [(2)], T. Viloria Samochín[(1)], F. Insua Piontti [(1)], A. Díez Juan [(2)], MJ. De los Santos Molina [(1)]

[(1)] IVI Valencia, Valencia, [(2)] Igenomix, Paterna, Valencia

18:00 - 18:30 hrs. Pausa

18:30 - 18:40 hrs. Exposición Mejor Póster 2017

Presidenta ASEBIR, Montserrat Boada, Salut de la Dona DEXEUS, Barcelona y Presidenta IX Congreso ASEBIR, Yolanda Mínguez, IVI Madrid, Madrid.

18:40 - 18:50 hrs. Distinción ASEBIR a los nuevos Centros de TRA con Certificación UNE 179007

Presidenta ASEBIR, Montserrat Boada, Salut de la Dona DEXEUS, Barcelona y Presidenta GI de Calidad, Nereyda Ortiz, Instituto Europeo de Fertilidad, Madrid.

18:50 - 19:00 hrs. Cierre y Clausura del Congreso

Presidenta ASEBIR, Montserrat Boada, Salut de la Dona DEXEUS, Barcelona y de la Presidenta del IX Congreso ASEBIR, Yolanda Mínguez, IVI Madrid, Madrid.

21:00 hrs. Cena de Clausura y Entrega del Premio EMB-ASEBIR 2017

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

llama ahora al
944 354 600
e infórmate

Teléfono exclusivo para Asociados comercializado por Segurmec

Con el **Seguro de Responsabilidad Civil Profesional** de Segurmec

Puedes contratar un **capital asegurado** de hasta **1.200.000 €**
Incluye **coberturas específicas** para nuestro colectivo tales como la **Garantía** de **Gametos** y **Preembriones** y la posibilidad de asegurar a las **Sociedades Profesionales** sin coste añadido

cmb bizkaiko medikuen elkargoa colegio de médicos de bizkaia
SEGURMEC ASEGURU-ARTEKARITZA S.M. CORREDURIA DE SEGUROS S.L.

ASEBIR Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción

SI ERES DE ASEBIR, TU NUEVO SEGURO DE COCHE* TE CUESTA 100 € MENOS.

Contrata ahora y ahórrate **100 € en tu seguro de coche, en la modalidad de todo riesgo con franquicia, solo por ser de ASEBIR.** Y, además, disfruta de **importantes descuentos en otras modalidades de coche, y en los seguros de moto, comercios, hogar y comercios + hogar.**

Llama ahora y aprovecha esta promoción exclusiva para ti y tus familiares directos.

913 278 992
www.zurich.es/colegiosprofesionales

ASEBIR Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción

ZURICH®

*Promoción válida para nuevas contrataciones (realizadas entre el 1 de febrero de 2017 y el 31 de diciembre de 2017) de póliza de Auto (turismos o furgonetas de uso particular) con la modalidad de todo riesgo con franquicia con pago anual y con tomador, conductor y/o propietario con al menos 5 años de carné. Para la mecánica y demás condiciones, y promociones para otras modalidades/productos, consulta las bases en http://colectivos.zurich.es/colegiosprof/promociones. Importe máximo por tomador: 250 euros, con independencia de las pólizas contratadas/modalidad. No acumulable a otras promociones. Producto intermediado por SegurMec Correduría de Seguros, S.L. DGSFP J1281. El corredor recomienda estos productos sobre la base del análisis objetivo previsto en la Ley de Mediación de seguros y reaseguros privados. Estos productos pertenecen a Zurich Insurance plc, Sucursal en España.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CONTAMINACIÓN AMBIENTAL EN EL FACTOR MASCULINO

Rafael Lafuente Varea [1,2] , Miguel Ángel Checa Vizcaíno [3,4] y Bénédicte Jacquemin [4,5,6,7,8,9]
[1] CIRH. EUGIN. Barcelona. Spain [2] Dpto. de Pediatría, Obstetricia y Ginecología, Medicina Preventiva y Salud Pública [3] Dpto. de Obstetricia y Ginecología, Hospital del Mar, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain [4] GRIB-Barcelona, Barcelona, Spain [5] UMR-S 1168, VIMA: Aging and chronic diseases. Epidemiological and public health approaches, INSERM, Villejuif, France [6] UMR-S 1168, Université Versailles Saint Quentin, France [7] ISGlobal- CREAL, Barcelona, Spain [8] Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain [9] CIBERESP-CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Barcelona, Spain.
Contacto: Bénédicte Jacquemin. ISGlobal, Institut de Salut Global de Barcelona - Campus MAR. Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB) (Office 190) Doctor Aiguader, 88 08003 Barcelona. Email: benedicte.jacquemin@isglobal.org ; Tel. +34 93 214 73 59

INTRODUCCIÓN

La población humana aumenta en progresión geométrica, y hay un aumento cada vez mayor de la demanda de alimentos y necesidades básicas. Se necesitan más materias primas y fuentes de energía, y la tendencia es vivir en grandes ciudades donde se acumulan sustancias tóxicas que pueden acabar en el aire, el agua o el suelo.

La contaminación ambiental es un concepto que cada vez está más presente en la sociedad, tiene más de 2.000.000 de entradas en Google y es un concepto que no sólo englobaría a la presencia en el ambiente de cualquier agente físico, químico o biológico, sino que está en relación también con la presencia de sustancias en nuestro organismo como consecuencia de algunos hábitos de vida. Cada vez más se habla también de otros tipos de contaminación como la acústica o la lumínica. En conjunto, se sospecha y existen evidencias, que se producen efectos en la naturaleza como el cambio climático, y concretamente en el ser humano con efectos perjudiciales para la salud ampliamente descritos.

Por tanto, es un concepto muy amplio, que también incluiría todas aquellas manifestaciones de la naturaleza que generan una fuente de contaminación: erupciones volcánicas, incendios, tormentas de arena, etc. La contaminación que proviene de la mano del hombre, conocida como contaminación antropogénica, proviene principalmente de industrias, agricultura, residuos domésticos, combustión de motores, etc.

La contaminación ambiental se ha asociado con una variedad de efectos en la salud bien conocidos, desde efectos subclínicos hasta la muerte (Chen *et al.*,2008; Hansen *et al.*, 2010). La mayoría de estudios se centran en resultados perinatales, pero hay una falta de conocimiento acerca de cómo afecta la contaminación ambiental a la calidad seminal (Glinianaia *et al.*, 2004; Hansen *et al*, 2010), y de si el efecto es similar en varones fértiles o infértiles. En la figura 1 se resumen los principales factores que pueden afectar a la fertilidad en hombres.

La calidad seminal, además de estar asociada a la fertilidad también es un indicador de la salud general del hombre. Esta se puede ver afectada por las alteraciones medioambientales, de los hábitos de vida de un individuo o de la exposición ocupacional. Dependiendo de la exposición se pueden producir efectos tóxicos directos o disrupciones hormonales. Algunas de estas exposiciones pueden producir cambios reversibles, pero a veces, cuando la exposición se produce en células germinales o en la pre-pubertad, aparecen secuelas permanentes. La interacción entre la exposición a la polución, los hábitos de vida y la exposición ocupacional, junto con los múltiples factores de confusión, dificulta el trabajo a la hora de encontrar una explicación a la disminución de la calidad seminal.

La necesidad de desarrollar las técnicas en Reproducción Humana Asistida se debe a una notable disminución de las tasas de fertilidad en las dos últimas décadas (Grant *et al*, 2006). La disminución de la calidad espermática en la especie humana es un hecho que ha recibido especial atención por parte de la comunidad científica, y puede ser responsable de hasta el 50% de los problemas de fertilidad. Se ha observado una disminución tanto en el contaje total de espermatozoides como en el volumen del eyaculado (Carlsen *et al.*, 1992), también como alteraciones en la morfología, independientemente de la edad e incluso en hombres

Figura 1. Factores que pueden contribuir a la infertilidad masculina

fértiles (Auger *et al.*, 1995). Es esencial comprender cuáles son las causas de esta disminución de la calidad espermática (Louis *et al.*, 2013). Y seguramente la explicación pueda estar en la incidencia de enfermedades crónicas (Lehtihet *et al.*, 2015; La Vignera *et al.*, 2012; Tvrda *et al.*, 2015), el consumo de tabaco (Harlev *et al.*, 2015), el alcohol (Muthusami *et al.*, 2005), la obesidad (MacDonald *et al.*, 2010), el estrés (Gollenberg *et al.*, 2010), y por supuesto, la exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), los metales pesados o los contaminantes atmosféricos (Deng *et al.*, 2016).

La causa de infertilidad masculina idiopática se sospecha que puede deberse a trastornos endocrinos como consecuencia de la contaminación ambiental o presencia de radicales libres (ROS), y la presencia de agentes xenobióticos que actúan como disruptores endocrinos, simulando a la actividad de hormonas estrogénicas (Giwercman *et al.*, 2011). Los efectos en particular se traducen en un aumento del cáncer testicular (Chia *et al.*, 2010), hipospadias, criptorquismo (Toppari *et al.*, 2010) y una reducción de la espermatogénesis debido a una disminución de las células de Sertoli durante la vida fetal (Oatley *et al.*, 2011). Aunque hasta ahora, ha sido difícil demostrar una causa efecto entre la contaminación atmosférica y estos efectos negativos para la función reproductiva en el hombre, algunos autores sugieren que el deterioro de la salud reproductiva puede ser causado por factores ambientales (Skakkebaek *et al.*, 2006).

En este sentido, está ampliamente aceptado que la polución del aire tiene efectos adversos para la salud en general del hombre (Brunekreef *et al.*, 2002), detectándose enfermedades cardiovasculares (Beelen *et al.*, 2014), enfermedades respiratorias (Sava *et al.*, 2012), efectos sobre el feto como defectos en el desarrollo neuronal (Yorifuji *et al.*, 2016). No hay que olvidar que la contaminación atmosférica ha sido clasificada por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) como carcinogénica en humanos (Loomis *et al.*, 2013). Se han realizado numerosos estudios en animales que indican una relación directa entre contaminación atmosférica y fertilidad, particularmente con la calidad del semen (Chen *et al.*, 2009; Ema *et al.*, 2013), pero en humanos todavía no se ha podido establecer una relación de forma clara.

En esta revisión, se hace una actualización del estado actual del conocimiento en relación a los principales agentes contaminantes ambientales y hábitos de vida que podrían afectar a la fertilidad masculina.

HÁBITOS DE VIDA

Se sospecha que los hábitos de vida son factores que pueden contribuir a la isminución paulatina de la calidad espermática (Sharma *et al.*, 2013; Barazani *et al.*,2014; Li *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013; Jurewicz *et al.*, 2014 y Sermondade *et al.*, 2012).

Hay mucha bibliografía disponible donde se estudian los principales hábitos de vida, incluido el tabaco, alcohol, cafeína, drogas, ejercicio físico, nivel de estrés, dieta, etc.

En todos los casos aparecen publicaciones que describen efectos negativos y otras que no observan diferencias. Seguramente, es necesario mejorar el diseño de los trabajos y controlar los factores de confusión. Está claro que el efecto sumatorio de practicar varios hábitos "negativos" a la vez, la interrelación con otros factores ambientales como la contaminación atmosférica, o que el efecto de los mismos sea acumulativo a lo largo de los años, puede dificultar su estudio a la hora de sacar conclusiones.

En un trabajo realizado por nuestro grupo (datos pendientes de publicar) se realizó un estudio en 172 individuos jóvenes y sanos, candidatos a donantes de semen, evaluando el efecto del consumo de tabaco, alcohol y cannabis en la calidad seminal. En esta población normozoospérmica, menores de 30 años, no observamos diferencias significativas de los principales parámetros seminales, excepto una disminución del volumen del eyaculado cuando había consumo de cannabis. Esto nos hace sospechar que a esta edad el cuerpo dispone de los mecanismos suficientes para minimizar el riesgo por el consumo de estas sustancias, pero seguramente depende de las dosis de consumo. También debe considerarse que el consumo de alcohol o tabaco en este grupo de individuos era moderado-bajo, y que debido a un efecto acumulativo, es probable que al cabo de los años pueda observarse una disminución de los parámetros seminales.

CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA

En Europa, la contaminación del aire asociada a fuentes industriales está mayoritariamente controlada y la fuente principal es el tráfico automotriz. Por tanto, el interés de investigar la contaminación atmosférica asociada a la industria ya no es relevante y se piensa que los niveles son demasiado bajos para tener consecuencias en la salud.

Se estima que una gran proporción de los habitantes de la población urbana en Europa está expuesta a niveles por encima de los valores recomendados por la unión Europea (23% a 45% de la población para PM_{10} > 20µg/m^3 ó 25% de la población para NO_2 > 40µg/m^3). La contaminación atmosférica es un problema de salud pública que concierne a una gran parte de la población (European Environment Agency, 2007). Las partículas gruesas (PM_{10} con un diámetro aerodinámico inferior o igual a 10 µm) penetran hasta los bronquiolos. Las partículas finas ($PM_{2.5}$) penetran hasta los alvéolos y las partículas ultrafinas ($PM_{0.1}$) penetran hasta el torrente sanguíneo.

Los gases reaccionan a cualquier nivel del tracto respiratorio. Los principales gases que forman parte de la contaminación atmosférica son: ozono (O_3), monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO_2), dióxido de nitrógeno (NO_2) y dióxido de azufre (SO_2). Todos estos contaminantes provocan a nivel local inflamación y estrés oxidativo y nitrosativo, pero también se ha demostrado que afecta a nivel sistémico, pudiendo provocar efectos nocivos en la salud en diversos sistemas y órganos incluyendo el sistema reproductivo.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

Los resultados preliminares con una cohorte de 172 individuos jóvenes y sanos, donde se ha valorado el efecto de la contaminación atmosférica en la calidad seminal (datos pendientes de publicar), no detectan efectos negativos estadísticamente significativos sobre la calidad seminal. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios (Rubes *et al.*, 2005; Selevan *et al.*, 2000 y Hansen *et al.*, 2010) donde tampoco se pudo demostrar efectos negativos de la polución en los parámetros seminales clásicos. No obstante, debe tenerse en cuenta que en este estudio los participantes son individuos menores de 30 años y sanos, la gran mayoría con una calidad seminal bastante superior a lo que se considera normal, y de alguna manera parece que este hecho contrarresta los efectos de la polución o incluso de los hábitos de vida.

OTROS FACTORES AMBIENTALES: METALES PESADOS Y DISRUPTORES ENDOCRINOS

Hay otros factores ambientales que deben considerarse, como los metales pesados:plomo, mercurio, cadmio, arsénico, níquel, etc. Se bioacumulan en el cuerpo provocando efectos tóxicos a corto y largo plazo, como retrasos en el desarrollo, cáncer, daños en el riñón, etc.

Hay otro gran grupo de sustancias denominadas disruptores endocrinos que actúan como sustancias estrogénicas, androgénicas o antiandrogénicas que pueden perturbar e interferir con la producción, liberación, transporte, metabolismo, unión o eliminación de las hormonas naturales del cuerpo responsables del mantenimiento homeostático de la regulación de procesos vitales y del desarrollo (Mendiola *et al.*, 2017).

Se trata de hasta 1.500 sustancias utilizadas como plaguicidas y herbicidas, biocidas, retardantes del fuego, o contaminantes plásticos que se encuentran en componentes alimenticios, farmacéuticos y productos de uso diario. Estos compuestos exógenos pueden provenir de ámbitos domésticos e industriales o de vertidos urbanos y rurales.

La población general está expuesta a disruptores endocrinos a través de la ingesta de comida contaminada, inhalación de aire y polvo contaminado y contacto con la piel, y algunas áreas están sujetas a un mayor riesgo debido a razones culturales y geográficas.

La exposición a disruptores endocrinos está relacionada con daños para la salud reproductiva en el hombre a nivel de una reducción de la calidad del semen, alteración en el desarrollo fetal resultando en malformaciones congénitas del tracto urogenital (criptorquidia, hipospadia, etc.) y aparición de tumores testiculares.

TEMPERATURA AMBIENTAL

Se trata de otro factor ambiental que se ha asociado a una disminución de la calidad seminal y que está relacionado con la contaminación atmosférica. Sabemos que la maduración del espermatozoide se realiza en el epidídimo, donde adquiere su funcionalidad completa a través de una diferenciación morfológica, y que es un proceso dependiente de la temperatura (Dun, 2012). Un incremento de temperatura a este nivel puede acabar afectando a la espermatogénesis provocando un descenso de la concentración, de la viabilidad, de la morfología, de la motilidad, de la integridad del acrosoma y de la estabilidad de la cromatina. Esta situación podría conllevar periodos de subfertilidad de manera temporal o permanente (Maya-Soriano *et al.*, 2015). Por este motivo es importante considerar este factor como posible factor extrínseco que podría alterar la calidad seminal.

Nuestro estudio que ha valorado el efecto de la temperatura ambiental en individuos jóvenes y con muestras repetidas, ajustando por diferentes factores de confusión como edad, tabaco, nivel económico-social y por contaminante atmosférico, identifica un efecto estadísticamente significativo de la temperatura ambiental, de manera que a mayor temperatura, mayor disminución de los parámetros seminales como el contaje total de espermatozoides y la movilidad progresiva (datos pendientes de publicar).

CONCLUSIONES

La calidad seminal es un tema de investigación de gran actualidad ya que tiene repercusión sobre la salud reproductiva. Numerosos estudios han demostrado qué factores ambientales podrían tener un efecto negativo sobre la calidad seminal, sin embargo muy pocos han estudiado los efectos de la contaminación atmosférica. Estos estudios muestran grandes limitaciones, ya que ninguno ha estimado la exposición a nivel individual y en ninguno de ellos las medidas de exposición a la contaminación atmosférica eran muy precisas. Pocos estudios han considerado la exposición a la contaminación atmosférica en diferentes intervalos de tiempo con el fin de estudiar los diferentes periodos de la espermatogénesis. Se necesitan más estudios, con muestras repetidas, con una estimación precisa de la exposición a la contaminación atmosférica, con parámetros seminales más precisos para comprobar si la exposición a la contaminación atmosférica tiene repercusiones sobre la calidad del semen.

Estamos expuestos de manera rutinaria a numerosos factores ambientales y la rutina diaria hace que no se le dé la importancia suficiente a algunos de ellos, muchas veces por falta de información o desconocimiento. Hay evidencias robustas acerca de que muchos de estos factores ambientales contribuyen a una disminución del potencial de fertilidad en humanos. Los hábitos de vida, la contaminación atmosférica, la exposición ocupacional, factores clínicos y genéticos, todos tienen implicaciones clínicas y de salud pública muy importantes, y pueden tener connotaciones hasta ahora desconocidas que conviene tener presente.

RECOMENDACIONES

Desde un punto de vista clínico, es importante tener presente cada uno de estos factores, realizar las preguntas necesarias a los pacientes, tanto al hombre como a la mujer, para

poder detectar cuáles son esos hábitos de vida que quizás puede modificar, o cuál es su nivel de exposición a la contaminación atmosférica. En muchas ocasiones, se producen estados subfértiles que podrían ser la explicación a la infertilidad idiopática. El estudio de estos factores en la pareja puede:

- Mejorar las expectativas de fertilidad de la pareja, se procura las condiciones óptimas para el embarazo.
- Aumentar el conocimiento por parte de los pacientes de los factores que pueden afectar a su propia fertilidad. La información a este nivel es primordial y la responsabilidad de abordarla recae sobre el clínico.

Desde el laboratorio sabemos que es difícil introducir mejoras importantes que hagan aumentar las tasas de embarazo de forma espectacular, la ciencia ya ha avanzado mucho en este sentido, y ahora toca apostar por pequeñas mejoras que poco a poco ayuden a mejorar los resultados, y no cabe duda que a nivel clínico los factores ambientales cada vez tienen más importancia.

BIBLIOGRAFÍA

Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. N Engl J Med 1995;332:281–5.

Barazani Y, Katz BF, Nagler HM, *et al*. Lifestyle, environment, and male reproductive health. UrolClin North Am. 2014;41:55–66.

Beelen R, Stafoggia M, Raaschou-Nielsen O, Andersen Z, Xun W, Katsouyanni K, *et al*. Long-term exposure to air pollution and cardiovascular mortality. Epidemiology 2014;25:368–78.

Brunekreef B, Holgate S. Air pollution and health. Lancet 2002;360:1233–42.

Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. BMJ 1992;305:609–13.

Chen H, Goldberg MS, Villeneuve PJ. A systematic review of the relation between long-term exposure to ambient air pollution and chronic diseases. Rev Environ Health. 2008 23(4):243–297.

Chen Q, Hong X, Song Y, Sun Q, Wang J. Effects of diesel exhaust particles on the quality of mouse sperm. Chin J Androl 2009;23:22–5.

Chia VM, Li Y, Quraishi SM, Graubard BI, Figueroa JD, Weber JP, *et al*. Effect modification of endocrine disruptors and testicular germ cell tumour risk by hormonemetabolizinggenes. Int J Androl 2010;33:588–96.

Deng Z, Chen F, Zhang M, Lan L, Qiao Z, Cui Y, *et al*. Association between air pollution and sperm quality: a systematic review and meta-analysis. Environ Pollut 2016;208(Pt B):663–9.

Dun MD, Aitken RJ, Nixon B. The role of molecular chaperones in spermatogenesis and the post-testicular maturation of mammalian spermatozoa. Hum Reprod Update. 2012 Jul;18(4):420-35.

Ema M, Naya M, Horimoto M, Kato H. Developmental toxicity of diesel exhaust: a review of studies in experimental animals. ReprodToxicol2013;42:1–17.

European Environment Agency (EEA). Europe's environment. The fourth assessment. Denmark. ISBN 978-92- 9167-932- 4. EEA, Copenhagen, 2007. P78

Giwercman A, Giwercman YL. Environmental factors and testicular function. Best Pract Res ClinEndocrinolMetab. 2011;25:391–402.

Glinianaia SV, Rankin J, Bell R, Pless-Mulloli T, Howel D. Particulate air pollution and fetal health: a systematic review of the epidemiologic evidence. Epidemiology. 2004;15(1):36–45.

Gollenberg AL, Liu F, Brazil C, Drobnis EZ, Guzick D, Overstreet JW, *et al*. Semen quality in fertile men in relation to psychosocial stress. FertilSteril2010;93:1104–11.

Grant J, Hoorens S, Sivadasan S, Loo MV, Davanzo J, Hale L, Butz W. Trends in European fertility: should Europe try to increase its fertility rate...or just manage the consequences? Int J Androl 2006; 29:17–24.

Hansen C, Luben TJ, Sacks JD, Olshan A, Jeffay S, Strader L, Perreault SD. The effect of ambient air pollution on sperm quality. Environ Health Perspect. 2010 Feb;118(2):203-9.

Harlev A, Agarwal A, Gunes SO, Shetty A, du Plessis SS. Smoking and Male Infertility: An Evidence-Based Review. World J Mens Health. 2015 Dec;33(3):143-60. Review.

Jurewicz J, Radwan M, Sobala W, Ligocka D, Radwan P, Bochenek M, Hanke W. Lifestyle and semen quality: role of modifiable risk factors. SystBiolReprod Med. 2014 Feb;60(1):43-51.

La Vignera S, Condorelli R, Vicari E, D'Agata R, Calogero AE. Diabetes mellitus and sperm parameters. J Androl 2012;33:145–53.

Lehtihet M, Hylander B. Semen quality in men with chronic kidney disease and its correlation with chronic kidney disease stages. Andrologia 2015;47:1103–8.

Li Y, Lin H, Li Y, *et al*. Association between socio-psychobehavioral factors and male semen quality: systematic review and meta-analyses. FertilSteril. 2011;95:116–123.

Li Y, Li Y, Zhou N, *et al*. Socio-psycho-behavioural factors associated with male semen quality in China: results from 1346 healthy men in Chongqing. J Fam Plan Reprod Health Care Fac Fam Plan Reprod Health Care. 2013;39:102–110.

Loomis D, Grosse Y, Lauby-Secretan B, Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, *et al*. The carcinogenicity of outdoor air pollution. Lancet Oncol2013;14:1262–3.

Louis JF, Thoma ME, Sørensen DN, McLain AC, King RB, Sundaram R, *et al*. The prevalence of couple infertility in the United States from a male perspective: evidence from a nationally representative sample. Andrology 2013;1:741–8.

MacDonald AA, Herbison GP, Showell M, Farquhar CM. The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis. HumReprodUpdate 2010;16:293–311.

Maya-Soriano MJ, TabernerE,Sabés-Alsina M, Ramon J, Rafel O, Tusell L, Piles M, López-Béjar M. Daily exposure to

summer temperatures affects the motile subpopulation structure of epididymal sperm cells but not male fertility in an in vivo rabbit model. Theriogenology. 2015; 84(3):384-389.

Mendiola J, Lázaro MJ. Disruptires endocrinos: fuentes y evidencias de sus efectos sobre la salud reproductiva masculina. En: Contaminación ambiental y manejo del estrés oxidativo en el factor masculino. Cuaderno de AndrologíaClínica. ASEBIR-ASESA. 1ª Edición. Madrid 2017:10-19

Muthusami KR, Chinnaswamy P. Effect of chronic alcoholism on male fertility hormones and semen quality. FertilSteril 2005;84:919–24.

Oatley MJ, Racicot KE, Oatley JM. Sertoli cells dictate spermatogonial stem cell niches in the mouse testis. BiolReprod 2011;84:639–45.

Rubes J, Selevan SG, Evenson DP, Zudova D, Vozdova M, Zudova Z, *et al*. Episodic air pollution is associ¬ated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. Hum Reprod. 2005;20(10):2776–2783.

Sava F, Carlsten C. Respiratory health effects of ambient air pollution. ClinChest Med 2012;33:759–69.

Selevan SG, Borkovec L, Slott VL, Zudova Z, Rubes J, Evenson DP and Perreault SD. Semen quality and reproductive health of young Czech men exposed to seasonal air pollution. Environ Health Perspect. 2000;108,887–894.

Sermondade N, Faure C, Fezeu L, *et al*., Obesity-Fertility Collaborative Group. Obesity and increased risk for oligozoospermia and azoospermia. Arch Intern Med. 2012;172:440–442.

Sharma R, Biedenharn KR, Fedor JM, Agarwal A. Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. ReprodBiolEndocrinol. 2013 Jul 16;11:66.

Skakkebaek NE, Jorgensen N, Main KM, Rajpert-De Meyts E, Leffers H, Andersson AM, Juul A, Carlsen E, Mortensen GK, Jensen TK, Toppari J. Is human fecundity declining? Int J Androl 2006; 29:2–11.

Toppari J, Virtanen HE, Main KM, Skakkebaek NE. Cryptorchidism and hypospadias as a sign of testicular dysgenesis syndrome (TDS): environmental connection. Birth Defects Res A ClinMolTeratol 2010;88:910–9.

Tvrda E, Agarwal A, Alkuhaimi N.Male reproductive cancers and infertility: a mutual relationship. Int J MolSci 2015;16:7230–60.

Yorifuji T, Kashima S, HigaDiez M, Kado Y, Sanada S, Doi H. Prenatal exposureto traffic-related air pollution and child behavioral development milestone delays in Japan. Epidemiology 2016;27:57–65.

PROTEÓMICA DEL ESPERMATOZOIDE

Rafael Oliva, Ferran Barrachina, Ada Soler-Ventura, Alberto de la Iglesia, Judit Castillo, Meritxell Jodar, Josep Lluís Ballescà
Grupo de Biologia Molecular de la Reproducción y el Desarrollo, Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Unidad de Genética, Facultat de Medicina y Ciencias de la Salut, Universitat de Barcelona, y Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínico de Barcelona.
Email: roliva@ub.edu - Tel 934021877

RESUMEN

El espermatozoide es el resultado final del proceso de espermatogénesis y representa una célula ideal para estudios proteómicos dada su facilidad de obtención y la disponibilidad de métodos para su purificación. Como resultado del trabajo de diversos grupos, actualmente ya se han identificado a través de técnicas proteómicas basadas en la espectrometría de masas (MS) un total de 6238 proteínas presentes en los espermatozoides humanos, un total de 2064 proteínas presentes en el plasma seminal y un total de 6612 proteínas presentes en el testículo maduro. Adicionalmente, diversas estrategias de proteómica diferencial están permitiendo la identificación de proteínas alteradas en distintos tipos de pacientes infértiles y en modelos experimentales. Globalmente los resultados están siendo claves para comprender mejor los mecanismos moleculares operantes en el espermatozoide normal y para la identificación de las alteraciones relacionadas con la infertilidad o esterilidad.

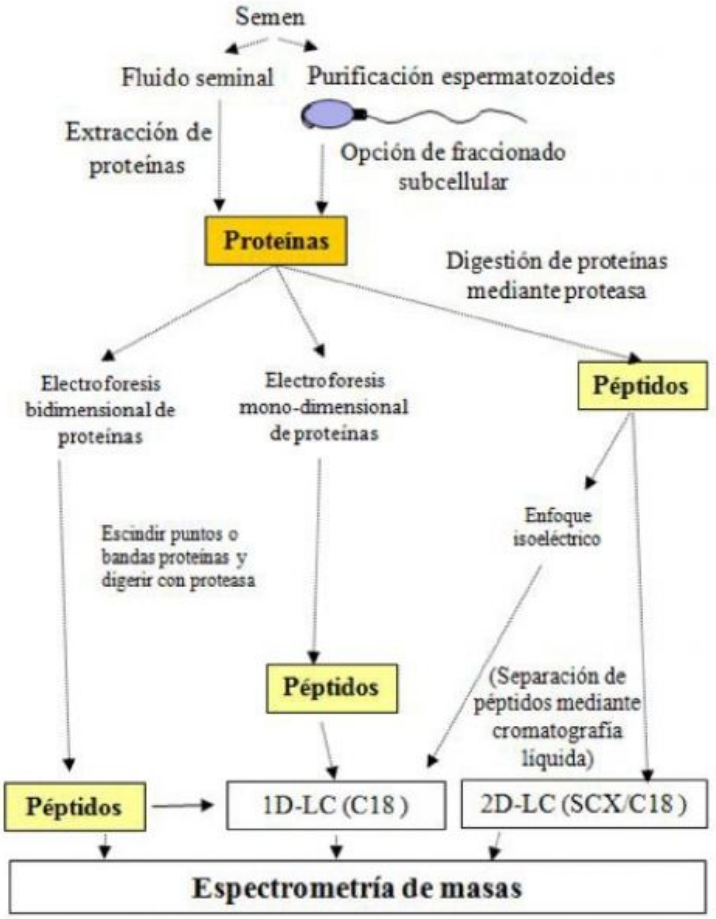
IDENTIFICACIÓN DEL PROTEOMA DEL ESPERMATOZOIDE, TESTÍCULO Y DEL PLASMA SEMINAL

Existen diversas estrategias posibles para la identificación de proteínas presentes en células o fluidos (Figura 1). Inicialmente, las estrategias se basaban en la extracción de las proteínas y su separación mediante electroforesis bidimensional seguida de la escisión de puntos proteicos y la identificación de las proteínas correspondientes mediante MS (Pixton *et al.*, 2004; Martínez-Heredia *et al.*, 2006). Pero actualmente la eficiencia de identificación se ha podido incrementar de forma considerable convirtiendo la mezcla inicial de proteínas en péptidos a través de su digestión con una proteasa y procediendo entonces a la separación de los péptidos mediante cromatografía líquida (LC) seguido de su identificación mediante MS en tándem (MS/MS; de Mateo *et al.*, 2013; Amaral *et al.*, 2014a; Bogle *et al.*, 2017). La clave de la MS es que permite identificar con mucha precisión la relación masa/carga de los péptidos generados a partir de una proteína, lo que constituye la base de su identificación. Un estudio típico de proteómica a partir de una muestra resulta en la identificación

y opcionalmente cuantificación de centenares a miles de proteínas (Codina *et al.*, 2015; Jodar *et al.*, 2017).

Aplicando estas estrategias diversos grupos hemos contribuido a identificar el proteoma del espermatozoide humano (Baker *et al.*, 2013; Amaral *et al.*, 2014a; Jodar *et al.*, 2017), plasma seminal (Gilani *et al.*, 2015) y testículo (Liu *et al.*, 2013). La compilación de los diversos estudios realizados en el espermatozoide humano maduro normal permitió generar un catálogo de las 6238 proteínas que lo componen (Amaral *et al.*, 2014a; Jodar *et al.*, 2017). El análisis de las rutas metabólicas y de los conjuntos de proteínas a partir de este catálogo ha permitido identificar aspectos clave para comprender mejor el funcionamiento del espermatozoide. Por ejemplo, centrándose en el metabolismo, ha sido posible detectar que el espermatozoide posee las enzimas y rutas metabólicas necesarias para obtener energía a partir de ácidos grasos, sugiriendo que este aspecto es más importante de lo que previamente se pensaba (Amaral *et al.*, 2013; Amaral *et al.*, 2014a). Y centrándose en las proteínas relacionadas con la cromatina se ha podido identificar que el espermatozoide posee una gran diversidad de proteínas relacionadas con la cromatina, a parte de las ya conocidas protaminas e histonas, abriendo la posibilidad de su contribución epigenética en el embrión (Castillo *et al.*, 2014a; 2014b).

De forma similar, el análisis proteómico del plasma seminal ha permitido identificar un total de 2064 proteínas, cuyo análisis está resultando clave para comprender su fisiología (Gilani *et al.*, 2015). Diversos grupos también han estudiado el testículo, en este caso resultando en la identificación de un total de 6612 proteínas presentes en el testículo maduro (Liu *et al.*, 2013). Recientemente la compilación y estudio comparativo de los proteomas del espermatozoide, plasma seminal y testículo, nos ha permitido identificar y aportar pistas muy importantes acerca de la comunicación o interrelación entre el espermatozoide y el plasma seminal (Jodar *et al.*, 2017). El plasma seminal representa aproximadamente el 95% del material presente en el semen, y su función es posiblemente mucho más importante de lo



Ejemplo de espectro:

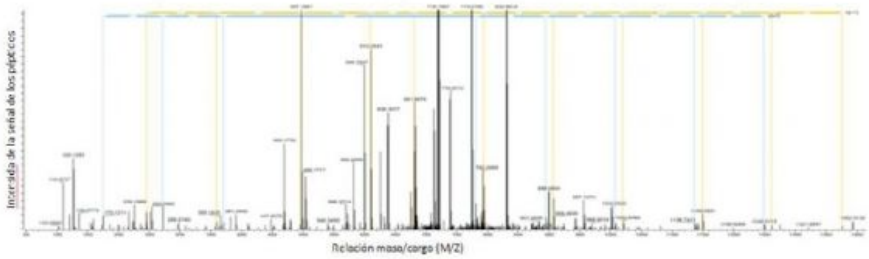


Figura 1. Opciones metodológicas principales en los estudios de proteómica a partir de semen. Cualquier estudio de proteómica debe de partir de proteínas. En la mayoría de casos las proteínas son convertidas en péptidos que son identificados a través de espectrometría de masas en tándem seguido del análisis de los espectros obtenidos. En la parte inferior de la figura se muestra el ejemplo del resultado de análisis MS/MS de un péptido correspondiente a la SRSF protein kinasa 1. La robustez de las técnicas de espectrometría de masas permite identificar de centenares a miles de proteínas en un solo experimento.

que hasta ahora se había pensado. De hecho, el espermatozoide recién producido por el testículo es inmóvil. Es durante su tránsito a través del epidídimo donde adquiere su potencial de motilidad tras su exposición a las secreciones epididimarias. Asimismo, el semen aporta las proteínas y elementos necesarios para permitir su capacitación y, en última instancia, la reacción acrosómica y fusión con el oocito. La existencia de proteínas presentes en el espermatozoide maduro o en el plasma seminal, pero ausentes en el proteoma testicular (198 proteínas), ha permitido postular que muchas de las proteínas presentes en el espermatozoide son importadas a partir del plasma seminal (Jodar *et al.*, 2017). Previsiblemente los resultados de diversos proyectos en marcha permitirán comprender los

detalles de los mecanismos y función de esta comunicación entre espermatozoide y plasma seminal, así como su posible disfunción en pacientes infértiles.

ALTERACIONES PROTEÓMICAS PRESENTES EN PACIENTE INFÉRTILES Y MODELOS EXPERIMENTALES

Existen dos conjuntos de estrategias posibles para la comparación proteómica de dos o más muestras; las basadas en el contaje espectral, y las basadas en el marcado diferencial de las proteínas o péptidos. El contaje espectral se basa en que cuanto más abundante sea una determinada proteína, más veces es previsible identificarla en un análisis de MS (Kichine *et al.*, 2013). Las estrategias de marcado diferencial consisten en el marcado de las proteínas o de los péptidos mediante marcadores isobáricos para MS (TMT; *tandem mass tags*). Se trata de reactivos que se unen covalentemente a ciertos aminoácidos y que difieren en su masa molecular debido a que incorporan isótopos no radioactivos específicos. Esto permite el marcado de muestras independientes utilizando marcadores TMT distintos que difieren en su masa, seguido de la agrupación de las distintas muestras marcadas y su identificación y procesado en masa (multiplexado) a través de cromatografía líquida y MS/MS (LC-MS/MS). Diversos grupos han utilizado esta estrategia para la identificación de las proteínas presentes en una abundancia diferencial en muestras de pacientes comparado con controles (Amaral *et al.*, 2014b; Azpiazu *et al.*, 2014; Bogle *et al.*, 2016).

Utilizando esta estrategia diversos grupos hemos podido identificar en pacientes con defectos de motilidad (astenozoospermia), diversas proteínas presentes en una abundancia alterada en comparación con muestras normozoospérmicas (Wang *et al.*, 2009, Amaral *et al.*, 2014b). Otro conjunto de experimentos interesantes son los que se han realizado con muestras de pacientes normozoospérmicos y con parejas con exploración ginecológica normal, pero que no obstante presentaban esterilidad de origen desconocido. En uno de los estudios se comparó a pacientes normozoospérmicos que resultaban embarazo después del uso de técnicas de reproducción asistida (TRA) con pacientes normozoospérmicos estériles que no resultaban en embarazo después de TRA (Azpiazu *et al.*, 2014). El resultado de este estudio permitió detectar la presencia de un total de 1717 proteínas de las cuales 35 estaban presentes en una abundancia aumentada y 31 presentes en una abundancia disminuida en el grupo que no consiguieron embarazo después de TRA comparado con el grupo que sí consiguió embarazo después de TRA. De forma interesante un 43% de las histonas detectadas (6 de 14) se hallaban aumentadas en el grupo que no consiguió embarazo, sugiriendo una alteración en la estructura de la cromatina del espermatozoide en estos pacientes. Otras proteínas alteradas que también indicaron un cambio epigenético potencial en estos pacientes fueron la *SRSF* protein kinasa 1 (SRPK1), el *Left-right determination* factor 1 (LEFTY1) y el *Growth/differentiation factor 1* (GDF15).

En otros estudios con enfoques ligeramente diferentes también se han detectado proteínas relacionadas con los resultados de reproducción asistida (Zhu *et al.*, 2013), con la calidad embrionaria obtenida a través de fecundación in vitro (FIV) convencional (Pixton *et al.*, 2004; Frapsauce *et al.*, 2014; Legare *et al.*, 2015), o con la calidad el blastocisto en día 5 después de inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI) (McReynolds *et al.*, 2014). A parte de los estudios proteómicos diferenciales de los espermatozoides de pacientes infértiles, también se están detectando alteraciones presentes en pacientes oligoastenozoospérmicos (Giacomini *et al.*, 2015) y en pacientes con morfología alterada o con diversos tipos de alteraciones (Wang *et al.*, 2009). De relevancia las técnicas de análisis proteómico diferencial están siendo aplicadas a modelos experimentales permitiendo identificar proteínas presentes en una abundancia alterada en respuesta a disruptores endocrinos, otros agentes de contaminación ambiental, y a fármacos o tóxicos (Maselli *et al.*, 2012; Kichine *et al.*, 2013; Zatecka *et al.*, 2014; Rengaraj *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2016).

En resumen, actualmente disponemos de catálogos muy detallados de las proteínas que componen el espermatozoide, plasma seminal y testículo humano, y disponemos de las herramientas para identificar proteínas presentes en una abundancia alterada en pacientes estériles. Es previsible que los avances que se obtendrán en los próximos años permitan la integración del proteoma del espermatozoide con los distintos niveles "-ómicos" (genoma, epigenoma, transcriptoma, metaboloma) (Castillo *et al.*, 2014a; Pantano *et al.*, 2015; Paiva *et al.*, 2015; Carrell *et al.*, 2016) y con sus alteraciones. Esto permitirá comprender mejor la fisiología reproductiva y la identificación de biomarcadores clínicamente útiles en el diagnóstico, pronóstico y orientación al tratamiento en parejas estériles.

AGRADECIMIENTOS

Los autores reconocen la labor de Raquel Ferreti y Alícia Diez por su asistencia en la caracterización de las muestras. Subvencionado con cargo al Ministerio de Economía y Competividad (fondos FEDER 'una manera de hacer Europa' proyectos PI13/00699 y PI16/00346), a través de la Fundación Salud 2000 (SERONO 13-015), y de EUGIN-UB (EU-REP 2014). M.J está subvencionada por la Generalitat de Catalunya (Pla estratègic de recerca i innovació en salut, PERIS 2016-2020). F.B está subvencionado por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte para la Formación de Profesorado Universitario (FPU15).

BIBLIOGRAFÍA

Amaral A, Castillo J, Estanyol JM, Ballesca JL, Ramalho-Santos J, Oliva R. Human sperm tail proteome suggests new endogenous metabolic pathways. Mol Cell Proteomics 2013;12(2):330-42.

Amaral A, Castillo J, Ramalho-Santos J, Oliva R. The combined human sperm proteome: cellular pathways and implications for basic and

clinical science. Hum Reprod Update 2014a;20(1):40-62.

Amaral A, Paiva C, Attardo Parrinello C, Estanyol JM, Ballescà JL, Ramalho-Santos J, Oliva R. Identification of Proteins Involved in Human Sperm Motility Using High-Throughput Differential Proteomics. J Proteome Res 2014b;13:5670-84.Azpiazu R, Amaral A, Castillo J, Estanyol JM, Guimerà M, Ballescà JL, Balasch J, Oliva R. High-throughput sperm differential proteomics suggests that epigenetic alterations contribute to failed assisted reproduction. Hum Reprod 2014;29,1225–1237.

Baker MA, Naumovski N,Hetherington L,Weinberg A,Velkov T,Aitken RJ. Headand flagella subcompartmental proteomic analysis of human spermatozoa. Proteomics 2013;13:61–74

Bogle OA, Kumar K., Attardo-Parrinello C., Lewis SEM., Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R. Identification of Protein Changes in Human Sperm throughout the Cryopreservation Process. Andrology 2017;5(1):10-22.

Carrell DT, Aston KI, Oliva R, Emery BR, De Jonge CJ. The "omics" of human male infertility: integrating big data in a systems biology approach. Cell Tissue Res 2016;363:295-312.

Castillo J, Amaral A, Azpiazu R, Vavouri T, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R. Genomic and proteomic dissection and characterization of the human sperm chromatin. Mol Hum Reprod 2014a;20:1041-53.

Castillo J, Amaral A, Oliva R. Sperm nuclear proteome and its epigenetic potential. Andrology 2014b;2(3):326-38.

Codina C, Estanyol JM, Fidalgo MJ, Ballescà JL, Oliva R. Advances in sperm proteomics: best-practise methodology and clinical potential. Expert Review of Proteomics 2015;12:255-277.

de Mateo S, Estanyol JM, Oliva R. Methods for the analysis of the sperm proteome. Methods Mol Biol 2013;927:411-422.

Frapsauce C, Pionneau C, Bouley J, Delarouziere V, Berthaut I, Ravel C, Antoine JM, Soubrier F, Mandelbaum J.Proteomic identification of target proteins in normal but nonfertilizing sperm. Fertil Steril 2014;102:372-380.

Giacomini E., B. Ura, E. Giolo, S. Luppi, M. Martinelli, R.C. Garcia, G. Ricci, Comparative analysis of the seminal plasma proteomes of oligoasthenozoospermic and normozoospermic men, Reprod Biomed Online 2015;30;522–531.

Gilany K, A. Minai-Tehrani, E. Savadi-Shiraz, H. Rezadoost, N. Lakpour, Exploring the human seminal plasma proteome: An unexplored gold mine of biomarker for male Infertility and male reproduction disorder, J Reprod Infertil 2015;16;61–71.

Huang Q, Luo L, Alamdar A, Zhang J, Liu L, Tian M, Eqani SA, Shen H. Integrated proteomics and metabolomics analysis of rat testis: Mechanism of arsenic-induced male reproductive toxicity. Sci Rep. 2016 Sep 2;6:32518.

Jodar M, Soler-Ventura A, Oliva R. Semen proteomics and male infertility. Journal of Proteomics 2017;162:125-134.

Kichine E, Di Falco M, Hales BF, Robaire B, Chan P. Analysis of the sperm head protein profiles in fertile men: consistency across time in the levels of expression of heat shock proteins and peroxiredoxins. PLoS One. 2013 30;8(10):e77471.

Liu M, Z. Hu, L. Qi, J. Wang, T. Zhou, Y. Guo, Y. Zeng, B. Zheng, Y. Wu, P. Zhang, X. Chen, W. Tu, T. Zhang, Q. Zhou, M. Jiang, X. Guo, Z. Zhou, J. Sha, Scanning of novel cancer/testis proteins by human testis proteomic analysis, Proteomics 2013;13;1200–1210.

Maselli J, Hales BF, Chan P, Robaire B. Exposure to bleomycin, etoposide, and cis-platinum alters rat sperm chromatin integrity and sperm head protein profile. Biol Reprod. 2012 May 31;86(5):166, 1-10.

Martínez-Heredia J, Estanyol JM, Ballesca JL and Oliva R.Proteomic identification of human sperm proteins. Proteomics 2006;6, 4356-4369.

McReynolds S, Dzieciatkowska M. Toward the identification of a subset of unexplained infertility: a sperm proteomic approach. FertilSteril 2014;102:692-699.

Paiva C, Amaral A, Rodriguez M, Canyellas N, Correig X, Ballesca JL, Ramalho-Santos J, Oliva R. Identification of endogenous metabolites in human sperm cells using 1H-NMR and GC-MS. Andrology 2015; 3:496-505

Pantano L, Jodar M, Bak M, Ballescà JL, Tommerup N, Oliva N, Vavouri T. The small RNA content of human sperm reveals pseudogene-derived piRNAs complementary to protein coding genes. RNA 2015;21:1085-1095.

Pixton KL, Deeks ED, Flesch FM, Moseley FL, Björndahl L, Ashton PR, Barratt CL, Brewis IA. Sperm proteome mapping of a patient who experienced failed fertilization at IVF reveals altered expression of at least 20 proteins compared with fertile donors: case report. Hum Reprod 2004;19:1438-1447.

Rengaraj D, Kwon W-S, Pang M-G. Effects of Motor Vehicle Exhaust on Male Reproductive Function and Associated Proteins. J. Proteome Res., 2015, 14 (1), pp 22–37

Sharma R., a. Agarwal, a. J. Hamada, R. Jesudasan, S. Yadav, E. Sabanegh, Proteomic analysis of seminal plasma proteins in men with various semen parameters, Fertil Steril 2012; 98;S148.

Wang J., Wang J., Zhang H.R., Shi H.J., Ma D., Zhao H.X., Lin B., Li R.S.. Proteomic analysis of seminal plasma from asthenozoospermia patients reveals proteins that affect oxidative stress responses and semen quality., Asian J Androl 2009;11;484–491.

Zatecka E, Castillo J, Elzeinova F, Kubatova A, Ded L, Peknicova J, Oliva R. The effect of tetrabromobisphenol A on protamine content and DNA integrity in mouse sperm. Andrology 2014;2:910-7.

Zhu Y, Wu Y, Jin K, Lu H, Liu F. Differential proteomic profiling in human spermatozoa that did or did not result in pregnancy via IVF and AID. Proteomics Clin Appl 2013;7:850-858.

RI Witness™

SISTEMA DE TRAZABILIDAD POR RADIOFRECUENCIA
GARANTIZA LA MÁXIMA SEGURIDAD EN LOS TRATAMIENTOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

EMB GRUPO www.embiol.com

RI

PRIMO VISION EVO +

SISTEMA DE MONITORIZACIÓN MORFOCINÉTICA MODULAR CON POSIBILIDAD DE OBSERVACIÓN EN TIEMPO REAL

- Cámara HD 5 Mpx, 0,3 pixel/micra, aprox. 25x
- Software Premium para medidas de fragmentación y asimetría de los blastómeros
- Cultivo en grupo

Vitrolife

G - TL

PRIMER MEDIO ÚNICO DISEÑADO ESPECÍFICAMENTE PARA TIME-LAPSE

Vitrolife

G - 210

OTRO NIVEL SUPERIOR EN LA INCUBACIÓN DE EMBRIONES

- Software que emula el ciclo basal natural
- Cámaras de incubación (10 + 1) calefactadas por los 6 lados
- Con EM Neutra tech. para evitar campos magnéticos en los cultivos

SYSTEMS K KIVEX BIOTEC LTD

Micropipetas VITROLIFE

MICROPIPETAS DE ALTA CALIDAD Y PRECISIÓN

- Toda gama de tipos y angulaciones
- Control de calidad -1 cel-MEA > 80% blastocito día 5
- Todas las micropipetas son inspeccionadas individualmente

Vitrolife

EMBIB GRUPO www.embiol.com

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

AFTER 25 YEARS OF PERFORMING ICSI, CAN WE STILL IMPROVE THE TECHNIQUE?

Joe Conaghan, PhD
Pacific Fertility Center, 55 Francisco St., Suite 500, San Francisco, CA 94133, USA
Email: joe@pacificfertility.com - Tel: 415 249 3637

"If you always put limits on everything you do, physical or anything else, it will spread into your work and into your life. There are no limits. There are only plateaus, and you must not stay there, you must go beyond them."

Bruce Lee[1]

INTRODUCTION

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) has been a revolutionary technique in the arena of assisted reproductive technologies (ART) that has stood the test of time and proven effective for the treatment of male factor infertility. ICSI has been so successful in fact, that many ART practitioners use ICSI on most or all patients, and not just those with sperm issues. In the United States in 2015 (SART preliminary data[2]), 77,603 out of a total of 107,775 IVF cycles (72%) in patients using their own oocytes used ICSI as the fertilization method. Male factor infertility was given as the primary diagnosis in only 14,599 (18.8%) of these ICSI cycles, and only 16,341 (15.2%) of all own oocyte cycles. Clearly ICSI is being overused, and its use is often justified in cycles with poor quality and/or low oocyte numbers. However, even in cycles that used donor oocytes (i.e. those cycles where oocyte quality and numbers should have been excellent), 4575/5982 (76%) of cycles used ICSI. The practice of performing ICSI for non-male factor patients is likely to continue despite the fact that ICSI and conventional insemination give similar fertilization rates in these patients[3]. The likelihood of complete fertilization failure is less likely with ICSI, although it does still occur in patients with small oocyte numbers, with globozoospermia and other clinical and technical situations.

The widespread adoption of ICSI happened quickly after the technique was developed and tested in Brussels in the early 1990's[4]. Prior to the availability of ICSI, few options existed for true male factor infertility patients other than standard insemination of oocytes with at least 100,000 spermatozoa/mL in the insemination medium. Although the origins of this insemination concentration are vague and may date back to 1932[5], it typically works well for patients with normal sperm samples[6], but is unreliable for patients with male factor infertility even if they have sufficient numbers of sperm for the insemination. Sub-optimal ejaculated sperm, and epididymal sperm all worked poorly when used for standard oocyte insemination[7].

In the late 1980's experiments with various assisted fertilization techniques such as partial zona dissection (PZD) and Sub zonal insemination (SUZI)[8] failed to establish a reliable fertilization technique and it was only the finding that human oocytes tolerated microinjection[9] that led to a breakthrough. The development of ICSI and its utility with fresh ejaculated sperm, frozen-thawed sperm, epididymal and testicular sperm, and even round spermatids[10,11] allowed male factor patients to reliably become fathers for the first time. Other than ICSI with round spermatids, which did not stand the test of time[12], ICSI with all other sperm sources has proven reliable even if the sperm are alive but not motile.

Early results with ICSI yielded fertilization rates approaching 70% of mature oocytes injected. The Belgian group that developed ICSI[13] had a normal fertilization rate of 64.2% in 1993 with a series of 150 patients with previous failed conventional insemination, and Palermo and colleagues[14] reported a 2PN rate of 64.5% in a large series of patients with male infertility in 1995 in New York. These numbers have not changed appreciably or consistently over the years with current studies[15,16] reporting similar fertilization rates (67% 2PN/mature oocyte injected).

Step 1	Immobilize the sperm cell and aspirate it tail first into the ICSI needle. Hold the oocyte with its polar body at the 6 o'clock position. Hold the sperm head about ½ a sperm length back from the tip of the needle.
Step 2	Push the needle through the zona pellucida and deep into the oocyte. Do not aspirate cytoplasm.
Step 3	Withdraw the needle about ½ way through the oocyte and push it into the stretched part of the oolema away from the polar body.
Step 4	If the oolema does not break, repeat step 3.
Step 5	If the needle breaks through the oolema, gently apply forward pressure to release the sperm into the oocyte cytoplasm.
Step 6	If the sperm does not move much past the needle tip, the oolema has healed. Pick the sperm up in the needle and repeat step 3
Step 7	If the sperm clears the needle tip and dives deep into the cytoplasm, withdraw the needle from the zona pellucida.

Table 1. The steps in the direct ICSI procedure.

More recent attention on ways to improve fertilization rates have focused on sperm selection using physiological intracytoplasmic sperm injection (PICSI; *Figure I*) or intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI), or on oocyte activation (see Jeve., *et al.*, (2017) for review[15]), and not on the ICSI technique itself. Here we present evidence that a modified ICSI technique, "Direct ICSI", may be useful in allowing embryologists to finally improve ICSI outcomes after 25 years of using the old technique.

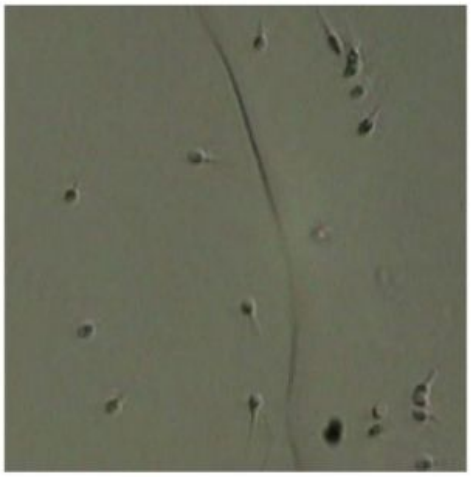


Figure I. PICSI uses mature sperm cells that bind to hyaluron on the surface of a dish. Sperm with receptors for hyaluron and which actively bind, can be picked up with an ICSI needle and injected into oocytes. But the technique does not improve fertilization rates after ICSI.

Figure II: Direct ICSI requires that the oocyte is positioned with the polar body at the 6 o'clock position and the sperm cell is held back from the tip of the needle as the needle is pushed through the zona pellucida and into the oocyte.

MATERIALS AND METHODS

THE TRADITIONAL ICSI PROCEDURE:

ICSI is performed with a fine glass needle and a single sperm is selected for injection into an oocyte from which the cumulus oophorus cells have been removed. Removal of the cells is necessary to visualize the oocyte and to perform the delicate procedure. Sperm cells are typically suspended in a polyvinyl pyrrolidone (PVP; 7-10% v/v) solution which slows their movement enough to allow the embryologist to identify individuals with better morphology for injection. The PVP, although not always used, also allows the operator greater control of the sperm in the needle, reduces sticking of the cell to the glass, and facilitates a slow controlled insertion of the sperm into the oocyte. The sperm cell is immobilized by rubbing the tail between the needle and the surface of the petri-dish, before the sperm is picked up tail first into the needle. This immobilization step is necessary even if the sperm are immotile, as disruption of the sperm membrane is required for fertilization. Once sperm preparation has been performed, the oocyte is held with a glass holding pipette and the sperm is injected at a location distant to the polar body to avoid the needle contacting the oocyte's chromosomes. The needle is pushed gently through the zona pellucida (ZP) and the oolema invaginates as the needle is pushed forward. To complete the ICSI, the oolema must be broken with force, by aspirating cytoplasm into the ICSI needle until the membrane breaks and cytoplasm flows freely. Once the needle is through the membrane, which is arguably the most technically difficult part of the procedure, the sperm cell can be dropped into the oocyte cytoplasm and the needle withdrawn. With the use of ejaculated ejaculated spermatozooa, a fertilization rate upwards of 70% is considered normal by embryologists proficient in the procedure.

THE DIRECT ICSI PROCEDURE:

The oocyte and sperm cells are prepared as per the traditional procedure and only the injection itself is different. It is recommended that the oocyte is specifically positioned with the polar body at the 6 o'clock position before beginning the injection. Also, the sperm is held back from the tip of the injection needle to prevent it from falling out during manipulation of the oolema. The sperm cell should be held at least half a sperms length back from the opening (see figure II) as the needle is brought to, and pushed through the zona pellucida.

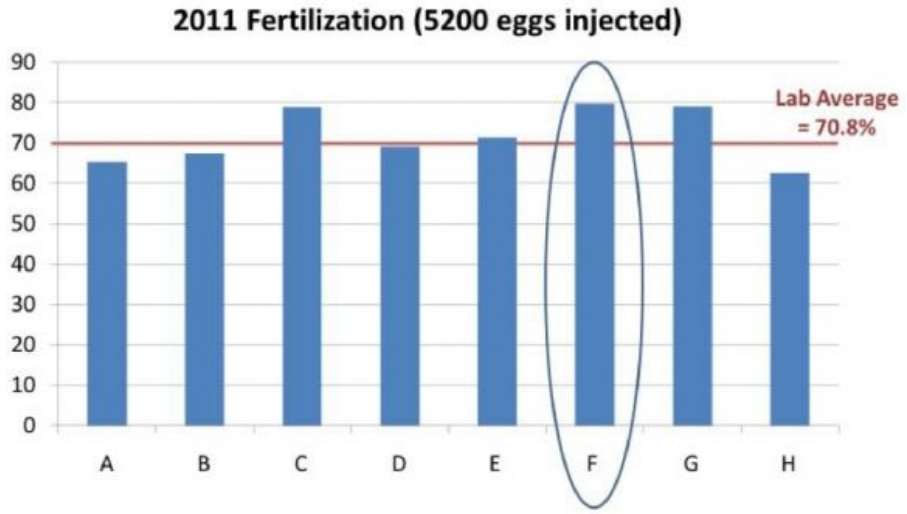


Figure III: Percentage normal fertilization (Y-axis) after ICSI by individual embryologists A-H (X-axis) in 2011. The average fertilization rate of 70.8% was acceptable but some embryologists were outliers. Embryologist H was consistently poor at performing the procedure and embryologist F managed 10% more fertilized oocytes than the laboratory average.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

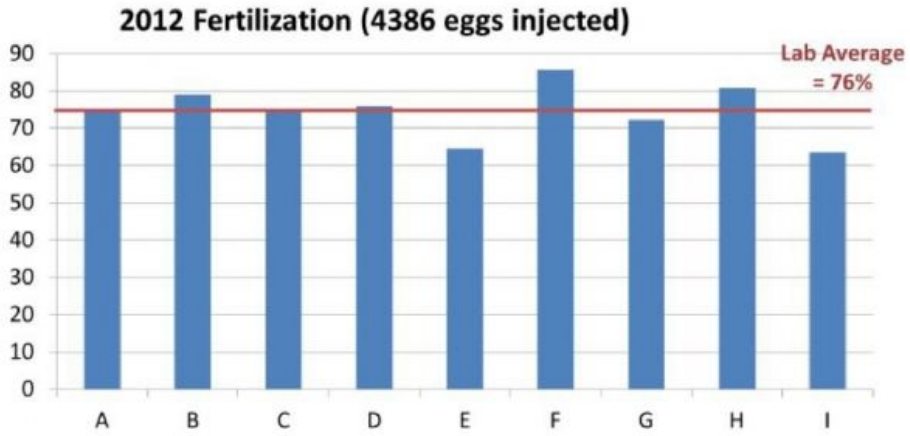


Figure IV: Percentage normal fertilization (Y-axis) after ICSI by individual embryologists A-I (X-axis). In 2012 the average fertilization rate (2 pronuclei/mature oocyte injected) inproved to 76% overall as a result of introducing the direct ICSI technique. Embryologist "F" continued to achieve better results that the other embryologists. A new embryologist, "B" who had solely been trained by embryologist "F" was also doing very well.

As with the traditional procedure, the oocyte membrane invaginates in front of the needle, creating a channel and stretching the oolema. The needle should be pushed all the way into the oocyte to stretch the oolema as much as possible. The needle is then withdrawn about half-way and pushed quickly into the stretched part of the oolema away from the polar body. If the needle "pops" through the membrane at this point, it is now inside the oolema and the sperm can be deposited. However, some oocytes will have more stretchable membranes than others and it may be necessary to repeat the process of stretching the membrane and pushing the needle into the stretched part until it goes through. The moment when the needle penetrates the membrane will be obvious as there is a subtle but sudden relaxing of the oolema as the needle goes through. In addition, once the membrane is truly penetrated, the sperm cell should shoot out of the end of the needle and infiltrate deep into cytoplasm of the oocyte. If at this moment, the sperm does not move much beyond the needle tip, or the sperm does not easily and freely move forward into the cytoplasm, the oolema has likely healed and the injection process should be repeated. The sperm cell is withdrawn into the needle and the stretching of the oolema repeated until the needle bursts through again. Inside the oocyte cytoplasm, the sperm must move freely forward and well away from the needle tip for the injection to be considered a success.

RESULTS

As part of normal laboratory operations and quality management, ICSI outcomes are calculated on a regular basis and an acceptable value is agreed upon for the fertilization rate. Historically, we calculated the number of mature oocytes that fertilized normally (2 pronuclei) and agreed that the technical proficiency of the embryologists was acceptable if the value was 70% or above. However, we realized in 2011 that this management procedure was suboptimal for 2 reasons. First, we calculated only the laboratory average and did not look at embryologists individually after their initial training and competency had been established. Second, the acceptable value of 70% had never been changed and we had therefore not made a serious effort to improve ICSI outcomes.

Once the outcomes had been broken down by embryologist, it was obvious that while the laboratory average fertilization rate was holding steady at 70%, there were outliers among the group (see Figure III). In particular, embryologist "F" who was new to our laboratory and trained elsewhere was able to consistently achieve a fertilization rate of 80% (see Figure III). After reviewing the results with the laboratory team we agreed that we should raise the acceptable threshold from 70% to 75% for the following year, 2012.

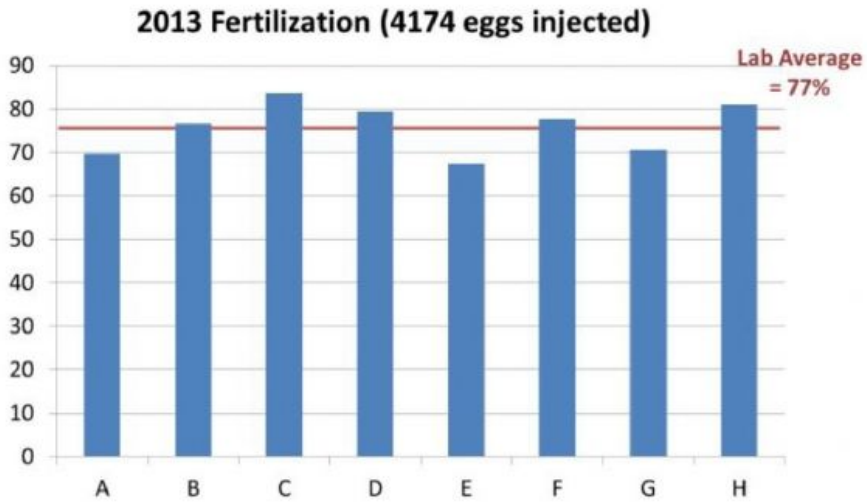


Figure V: Percentage normal fertilization (Y-axis) after ICSI by individual embryologists A-H (X-axis). The 2013 data improved slightly on the previous year and continued to exceed the fertilization threshold of 75%. In addition to embryologists F and B doing well, more of the other embryologists achieved consistency closer to the laboratory average as a result of proficiency in the direct ICSI technique.

In addition to raising the acceptable threshold, we also agreed that a trainee embryologist who was ready to learn ICSI would only be trained by embryologist "F". That way, the trainee embryologist would only learn the new procedure and would be expected to achieve high fertilization rates once trained. By the end of 2012, this embryologist was doing well (Figure IV, Embryologist "B"), and was above the lab average of a 76% fertilization rate for the year. Embryologist "F" had improved over her previous year's performance too, as had most of the other embryologists. This was a consequence of introducing the direct ICSI procedure and having all the embryologists learn the new technique.

The results from 2012 and 2013 (Figures IV and V) showed that improvements could be made and in 2014 it was decided that the minimum acceptable value for fertilization rates with ICSI should be raised to 80%. In addition, it was decided that each ICSI case would be split between 2 embryologists whenever practical. This resulted in cases with just 2-3 oocytes being performed by a solo embryologist, but cases with better oocyte numbers, typically >6, would be performed by 2 individuals who would each inject half the oocytes. This later adjustment to the procedure introduced some friendly competition between embryologists and also allowed us to determine if a poor outcome was due to some personnel or technical issue, or if it was more likely due to the quality of the gametes. These changes paid off and we were able to succeed in getting an 80% fertilization rate that year (Figure VI) and achieve a very high level of consistency among embryologists.

DISCUSSION

The introduction of direct ICSI into the laboratory has allowed us to improve fertilization rates from 70% to 80% over a 4 year period (Figures III-VI). Prior to the introduction of this new technique, fertilization rates were stagnant and we had not worked to improve them. Taking a closer look at our ICSI performance and breaking it down by individual embryologist allowed us to identify outliers with fertilization rates well above or below the average for the group. Once identified, the poor performers had the opportunity for retraining with direct ICSI to improve their technique. This worked well and by the end of 2014 we had achieved very good consistency between embryologists (Figure VI). A trainee embryologist that was ready to learn ICSI was also trained only in the new procedure and has since had remarkable results (Figures V and VI) and regularly outperforms embryologists that have been performing ICSI for over 20 years.

The direct ICSI procedure takes time to learn and perfect and an individual embryologist needs to work on the technique for months to become proficient. The key steps in the procedure are spelled out in table 1. Firstly, it is important that the sperm and oocyte are prepared in the same manner as for a regular injection, but the sperm head must be held back from the end of the needle when entering the oocyte. The needle is moved around inside the zona pellucida in repeated attempts to push it through the oolema. This movement resembles a stirring motion and results in the sperm moving down the needle in an involuntary manner. After 2, 3 or 4 movements back and forth, the sperm has usually migrated close to the needle tip when no forward pressure is being applied to the needle. Secondly, the needle must penetrate the oolema such that the oocyte membrane visibly relaxes as the tip of the needle goes through. If the membrane does not break, the embryologist must continue stretching and pushing into the membrane until it is penetrated. No aspiration pressure is applied to the needle while in contact with the intact oolema. And lastly, the sperm must move easily clear of the end of the needle once in the oocyte cytoplasm. This is the most important part of the technique. If the sperm does not shoot out of the needle and go deep into the cytoplasm, the oolema has likely healed and the sperm may not truly be inside the oocyte. The further the sperm moves away from the needle and the deeper it travels into the oocyte, the more likelihood there is that the technique has been applied correctly.

ACKNOWLEDGEMENTS

I am grateful to the exceptional group of embryologists that I am privileged to work with every day: Erin Fischer, Amy Jacobs, Jean Popwell, Jennifer Andres, Valerie Hines, Gina Cirimele, Kathrin Buchanan, Anya Sokolova and Jinnuo Han.

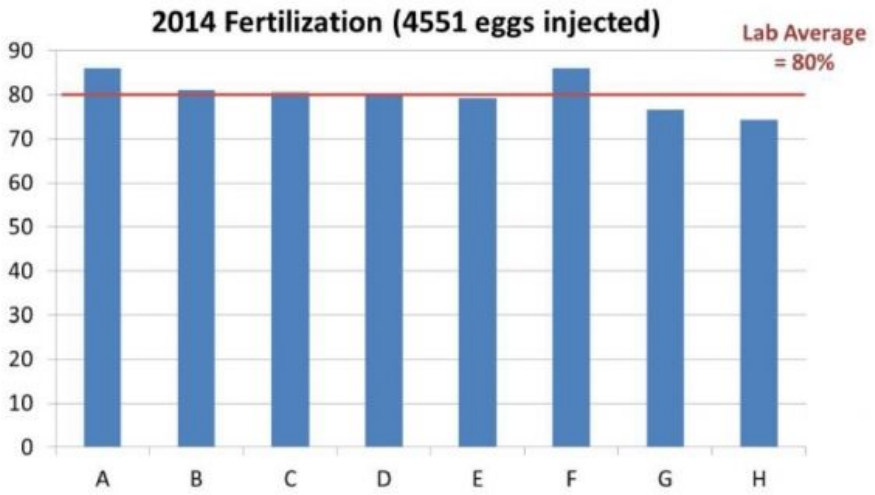


Figure VI: Percentage normal fertilization (Y-axis) after ICSI by individual embryologists A-H (X-axis). In 2014 we achieved a lab average of 80% normal fertilization per mature oocyte injected. We also achieved high consistency among the embryology group.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

REFERENCES

Lee, B., (1998), The Art of Expressing the Human Body, Edited by John R. Little, Tuttle Publishing, China, p. 23.

Society for Assisted Reproductive Technology (SART) National Summary Report, https://www.sartcorsonline.com/rptCSR_PublicMultYear.aspx?reportingYear=2015

Staessen, C., *et al.*, (1999), Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in sibling oocytes from couples with tubal infertility and normozoospermic semen, Hum Reprod, Oct;14(10):2474-9.

Palermo, G.D., *et al.*, (1992), Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte, Lancet. 4;340(8810):17-8.

Huxley, A., (1932), Brave New World, Harper Brothers Publishers, New York

WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, Fifth edition (2010), World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research.

Temple-Smith, P.D., *et al.*, (1985), Human pregnancy by in vitro fertilization (IVF) using sperm aspirated from the epididymis, J In Vitro Fert Embryo Transf. 2(3):119-22.

Sakkas, D., *et al.*, (1993), IVF treatment of moderate male factor infertility: a comparison of mini-Percoll, partial zona dissection and sub-zonal sperm insertion techniques, Hum Reprod. 8(4):587-91.

Lanzendorf, S.E., *et al.*, (1988), A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes, Fertil Steril., 49(5):835-42.

Gianaroli, L., *et al.*, (1999), Birth of a healthy infant after conception with round spermatids isolated from cryopreserved testicular tissue, Fertil Steril., 72(3):539-41.

Tesarik, J., *et al.*, (2000), Birth of healthy twins after fertilization with in vitro cultured spermatids from a patient with massive in vivo apoptosis of postmeiotic germ cells., Fertil Steril., 74(5):1044-6.

Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine; Practice Committee of Society for Assisted Reproductive Technology., (2008), Round spermatid nucleus injection (ROSNI).,, Fertil Steril. 90(5 Suppl):S199-201

Van Steirteghem, A.C., *et al.*, (1993), High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection, Hum Reprod., 8(7):1061-6.

Palermo, G.D., *et al.*, (1995), Development and implementation of intracytoplasmic sperm injection (ICSI), Reprod Fertil Dev., 7(2):211-7

Jeve, Y.B., *et al.*, (2017), Strategies to improve fertilisation rates with assisted conception: a systematic review, Hum Fertil (Camb)., 26:1-19

Tannus S., *et al.*, (2017), The role of intracytoplasmic sperm injection in non-male factor infertility in advanced maternal age, Hum Reprod.. 32(1):119-124.

OLYMPUS

Your Vision, Our Future

THINK Quality

Solo con OLYMPUS lo verás así

Microscopio invertido

IX73

Descubre un micromanipulador flexible, ergonómico y fácil de usar.

Más información en:
www.olympus4art.com

Imagen cedida por:
embryotools

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

MICRORNAS Y REPRODUCCIÓN. UN NUEVO HORIZONTE MOLECULAR

Juan Manuel Moreno Moya
Oslo University Hospital, Oslo, Norwegian.
Email: jmmormoy@gmail.com - Tel: 640051763

INTRODUCCIÓN, MATERIAL Y MÉTODOS

Los microARNs, también denominados miARNs, son secuencias cortas de ARN (19-22 nucleótidos) no codificantes que funcionan como reguladores endógenos de la expresión génica.

Estas moléculas fueron descritas por primera vez hace dos décadas (Lee *et al*. 1993, Wightman *et al*. 1993). El equipo liderado por el Dr. Ambros identificó un tipo de ARN de 22 nucleótidos derivado del gen lin-4 en C. Elegans al que bautizaron con el nombre de let-7. Dicha molécula era capaz de reprimir la traducción de lin-14, otro RNA mensajero mediante su unión por complementariedad con la región 3'-UTR de dicho mensajero. Siete años más tarde varios homólogos de let-7 fueron hallados conservados en humanos y otras especies de vertebrados (Ambros 2004). Poco después, los microARNs fueron correlacionados con cáncer y otras patologías, y desde entonces, el número de miARNs descubiertos y el interés en su funcionamiento ha incrementado exponencialmente (Bartel 2004, Pasquinelli *et al*. 2000). En la actualidad, se han descrito 2588 miARNs de origen humano.

La sencillez de la molécula de miARN le confiere un grado importante de complejidad a la hora de descifrar su función, puesto que un miARN es capaz de complementar y regular cientos de ARN mensajeros diferentes y a su vez un ARNm puede contener diversos sitios de unión para diferentes miARNs.

Normalmente los miARNs son transcritos como largos miARNs primarios por las ARN polimerasas II y III; a continuación son procesados por las enzimas Dgcr8 y Drosha y convertidos a pre-miARNs; seguidamente esta horquilla de ARN es exportada al citoplasma donde la enzima Dicer la reconoce y la corta formando un dúplex miARN:miARN. La proteína Argonauta II (junto con otras) incorpora una de las hebras de miARN ya maduro y forma el denominado complejo RISC (Complejo de silenciamiento inducido por ARN). Este complejo rastrea las regiones 3'-UTR de los ARN mensajeros y cuando encuentra una región parcialmente complementaria con la del miARN se une a ella, dirigiendo la degradación de dicho mensajero o inhibiendo su traducción, resultando todo esto en el silenciamiento génico (Figura 1) (Moreno-Moya *et al*. 2014).

La nomenclatura de los miARNs requiere una mención especial. Ésta ha sido estandarizada para ser capaz de soportar el rápido descubrimiento que se ha experimentado. De esta forma, por ejemplo, un miARN denominado "Hsa-miR-19b-1-5p" indicaría: "Hsa" Homo sapiens; "miR" microARN; "19" corresponde al puesto que ocupa en orden de descubrimiento; "b" indica que es uno de los miembros de una familia de miARNs transcritos desde el mismo gen; "1" para identificar cuando existen diversas duplicaciones en el genoma que pueden dar lugar al mismo miARN maduro; "5p" se refiere al lado de la horquilla de pre-miARN del que deriva el miARN maduro.

Los miARNs han sido descritos recientemente como mediadores de comunicación intercelular, siendo capaces de viajar de un órgano a otro a través del torrente sanguíneo. La forma en la que pueden viajar sin resultar degradados se debe a que pueden ser secretados en el interior de microvesículas o exosomas, mediante su asociación con proteínas como Argonauta, o incluso en otras moléculas lipídicas como HDL y VDL (Chen *et al*. 2012).

A continuación, vamos a enumerar diferentes aspectos que abarca la fisiología de la reproducción humana y ejemplarizaremos diferentes estudios sobre miARNs recientemente publicados que introducen la importancia de estas moléculas durante dichos procesos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PAPEL DE LOS MIARNS DURANTE LA ESPERMIOGÉNESIS.

Un reciente trabajo de revisión publicado por Hilz y colaboradores en 2016 hace una lista de los diferentes estudios en modelo murino en los que el bloqueo de diferentes enzimas de procesamiento de microARNs (Dicer, Dgcr8 y Drosha) condicionado a diferentes momentos de la espermiogénes, resultan en un incremento importante de apoptosis, defectos acrosómicos, de condensación y otros aspectos morfológicos en los espermatozoides murinos (Hilz *et al*. 2016).

PAPEL DE LOS MIARNS DURANTE LA OVOGENESIS.

En el mismo trabajo de Hilz, estos investigadores mencionan el efecto de estos ratones mutantes condicionales para Dicer, Drosha y Dgcr8 sobre la ovogénesis. En concreto, la ausencia de Dicer durante la proliferación de las PGCs (Células Germinales Primordiales) reduce el número de oogonias; además, la ausencia de cualquiera de las tres enzimas generan defectos de spindle en ovocitos MI y MII.

PAPEL DE LOS MIARNS DURANTE LA FOLICULOGÉNESIS.

Aún se desconoce claramente la influencia molecular de los miARNs presentes en las células de las granulosas y el desarrollo folicular, pero se ha observado perfiles de miARNs presentes en las células del cúmulo que equivalen a los hallados libres en líquido folicular y que han

sido asociados a diferentes estadios madurativos del ovocito. Sin embargo, queda por determinar si estos hallazgos son la causa o consecuencia del desarrollo folicular (Moreno *et al*. 2015).

PAPEL DE LOS MIARNS DURANTE LA ESTEROIDOGENESIS.

Estudios in vitro sobre células de la granulosa de ratón han observado que el miARN mmu-miR-133b es capaz de inducir la producción de estradiol por dichas células (Dai *et al*. 2013).

PAPEL DE LOS MIARNS DURANTE EL DESARROLLO PREIMPLANTACIONAL.

En 2010, Svoboda y colaboradores resumieron los principales trabajos sobre los niveles de determinados miARN durante el desarrollo preimplantacional y observaron que, al igual que ocurre con los ARNm, la transcripción de miARNs experimenta diferentes oleadas de expresión de manera que existen: miARNs que son heredados de forma materna y que van degradándose a lo largo de las sucesivas divisiones ej. Familias let-7 y miR-30; otros miARNs que activan su expresión cuando el cigoto inicia la activación genómica ej. clúster miR-290; o miARNs que son heredados de forma materna y van consumiéndose pero a partir de la activación genómica la expresión de éstos aumenta ej. Familia miR-200 (Svoboda and Flemr 2010).

PAPEL DE LOS MIARNS DURANTE LA IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA.

En este sentido, existen trabajos que han determinado la presencia de un perfil de miARNs específico durante la ventana de implantación. En concreto, el trabajo publicado por Vilella y colaboradores determina la presencia de miARNs en el fluido endometrial durante la ventana de implantación. Además, han observado en un modelo in vitro cómo el embrión murino peri-implantatorio es capaz de incorporar miARNs presentes en el medio de cultivo, planteando la cuestión de si es extrapolable a humanos y la posible intercomunicación entre madre y embrión previo a la implantación (Vilella *et al*. 2015). Por otro lado, otros grupos han identificado ciertos miARNs que se han visto desregulados entre embriones euploides y aneuploides, involucrándolos con el éxito o no de la implantación (Rosenbluth *et al*. 2013).

PAPEL DE LOS MIARNS DURANTE EL DESARROLLO PLACENTARIO.

El grupo de Miura y colaboradores en 2010 determinó el incremento de determinados miARNs en el plasma materno durante el primer y tercer trimestre de embarazo, y cómo tras pasar unas horas tras el parto estos niveles descienden hasta ser prácticamente indetectables en plasma (Miura *et al*. 2010).

PAPEL DE LOS MIARNS EN OTRAS PATOLOGÍAS ASOCIADAS CON INFERTILIDAD.

Se han determinado perfiles de miARNs en pacientes que padecen síndrome de ovario poliquístico (Liu *et al*. 2015), en pacientes con endometriosis en relación a la angiogénesis y factores fibrinolíticos (Braza-Boils *et al*. 2014), e incluso se han hallado polimorfismos en determinados alelos de miARNs asociados con abortos de repetición (Amin-Beidokhti *et al*. 2017).

PAPEL DE LOS MIARNS EN COMPLICACIONES OBSTÉTRICAS.

También se han asociado niveles de miARNs con procesos como la preeclampsia (Wu *et al*. 2012), en restricción del crecimiento fetal intrauterino (Tang *et al*. 2013) y en casos de embarazos ectópicos (Domínguez *et al*. 2014).

¿QUÉ PODEMOS HACER CON LOS MIARNS?

Los miARNs debido a su tamaño y asociación con proteínas y lípidos son moléculas altamente resistentes a la degradación por ARNasas, además puesto que circulan en sangre, resultan ideales para ser utilizadas como biomarcadores. Además, gracias a su elevado número, es posible diseñar firmas transcriptómicas. Sin embargo, los problemas de estandarización, variabilidad en el procesamiento y la necesidad de normalización usando Spikes artificiales en lugar de controles endógenos, dificultan su desarrollo y aplicación.

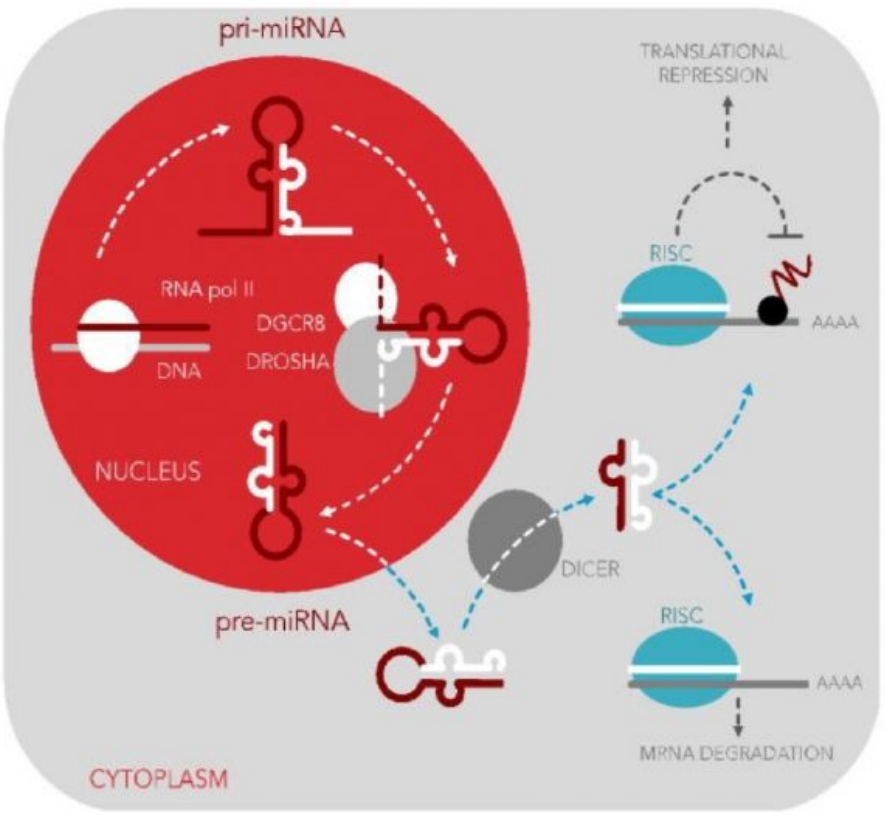


Figura 1. Biogénesis y mecanismo de acción de los microARNs

Otra opción que nos ofrecen los miARNs es que pueden ser utilizados como agentes farmacológicos.

La facilidad para sintetizar miARNs de forma artificial ha creado un catálogo de moléculas que podrían ser utilizadas para mimetizar (mimics), para bloquear (anti-miRs) e incluso con capacidad de secuestrar (esponjas, máscaras y Borradores) otros miARNs. En un trabajo de revisión en 2012, Eva van Rooij enumera los diferentes antimiRs que están siendo desarrollados para bloquear miARNs hallados en diferentes patologías (van Rooij and Olson 2012).

El número de patentes asociadas a miARNs tanto para su uso como biomarcadores y/o agentes farmacológicos genera casi 45.000 resultados en "google patent search". De manera que su aplicación a nivel clínico no queda lejos. De hecho, en cuanto a reproducción humana, ya se han elaborado patentes que plantean el uso de determinados miARNs secretados por los embriones en los medios de cultivo como nuevo método de selección, así como para mejorar la formulación de los medios de cultivo (Patente numero: WO2013056002A1).

Como conclusión, los miARNs son prometedores biomarcadores y agentes farmacológicos que parecen estar involucrados a lo largo de todas las áreas de la fisiología de la reproducción humana. Sin embargo, aún queda por determinar su utilidad en el día a día de los tratamientos.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a los organizadores del congreso ASEBIR, y en especial a Irene Cuevas Sainz, por invitarme a dar a conocer un poco más este pequeño ejército de moléculas.

BIBLIOGRAFÍA

Ambros V. The functions of animal microRNAs. Nature 2004:431:350-355.

Amin-Beidokhti M, Mirfakhraie R, Zare-Karizi S and Karamoddin F. The role of parental microRNA alleles in recurrent pregnancy loss: an association study. Reprod Biomed Online 2017:34:325-330.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 2004:116:281-297.

Braza-Boils A, Mari-Alexandre J, Gilabert J, Sánchez-Izquierdo D, Espana F, Estelles A and Gilabert-Estelles J. MicroRNA expression profile in endometriosis: its relation to angiogenesis and fibrinolytic factors. Hum Reprod 2014:29:978-988.

Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K and Zhang CY. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. Trends Cell Biol 2012:.

Dai A, Sun H, Fang T, Zhang Q, Wu S, Jiang Y, Ding L, Yan G and Hu Y. MicroRNA-133b stimulates ovarian estradiol synthesis by targeting Foxl2. FEBS Lett 2013:587:2474-2482.

Domínguez F, Moreno-Moya JM, Lozoya T, Romero A, Martinez S, Monterde M, Gurrea M, Ferri B, Nunez MJ, Simon C *et al*. Embryonic miRNA profiles of normal and ectopic pregnancies. PLoS One 2014:9:e102185.

Hilz S, Modzelewski AJ, Cohen PE and Grimson A. The roles of microRNAs and siRNAs in mammalian spermatogenesis. Development 2016:143:3061-3073.

Lee RC, Feinbaum RL and Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 1993:75:843-854.

Liu S, Zhang X, Shi C, Lin J, Chen G, Wu B, Wu L, Shi H, Yuan Y, Zhou W *et al*. Altered microRNAs expression profiling in cumulus cells from patients with polycystic ovary syndrome. J Transl Med 2015:13:238-015-0605-y.

Miura K, Miura S, Yamasaki K, Higashijima A, Kinoshita A, Yoshiura K and Masuzaki H. Identification of pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma. Clin Chem 2010:56:1767-1771.

Moreno JM, Nunez MJ, Quinonero A, Martinez S, de la Orden M, Simon C, Pellicer A, Diaz-Garcia C and Domínguez F. Follicular fluid and mural granulosa cells microRNA profiles vary in in vitro fertilization patients depending on their age and oocyte maturation stage. Fertil Steril 2015:104:1037-1046.e1.

Moreno-Moya JM, Vilella F and Simon C. MicroRNA: key gene expression regulators. Fertil Steril 2014:101:1516-1523.

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Muller P *et al*. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. Nature 2000:408:86-89.

Rosenbluth EM, Shelton DN, Sparks AE, Devor E, Christenson L and Van Voorhis BJ. MicroRNA expression in the human blastocyst. Fertil Steril 2013:99:855-861.e3.

Svoboda P and Flemr M. The role of miRNAs and endogenous siRNAs in maternal-to-zygotic reprogramming and the establishment of pluripotency. EMBO Rep 2010:11:590-597.

Tang Q, Wu W, Xu X, Huang L, Gao Q, Chen H, Sun H, Xia Y, Sha J, Wang X *et al*. miR-141 contributes to fetal growth restriction by regulating PLAG1 expression. PLoS One 2013:8:e58737.

van Rooij E and Olson EN. MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and obstacles. Nat Rev Drug Discov 2012:11:860-872.

Vilella F, Moreno-Moya JM, Balaguer N, Grasso A, Herrero M, Martinez S, Marcilla A and Simon C. Hsa-miR-30d, secreted by the human endometrium, is taken up by re im lantation embryo and might modify its transcriptome. Development 2015:142:3210-3221.

Wightman B, Ha I and Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. Cell 1993:75:855-862.

Wu L, Zhou H, Lin H, Qi J, Zhu C, Gao Z and Wang H. Circulating microRNAs are elevated in plasma from severe preeclamptic pregnancies. Reproduction 2012:143:389-397.

Técnicas de reproducción asistida de última generación

Productos y servicios específicos para cada paso del ciclo de TRA

Durante los últimos años varias de las empresas más sólidas y fiables en las diferentes técnicas de reproducción asistida (TRA) se han consolidado bajo el manto de CooperSurgical como buque insignia, con la única finalidad de crear una compañía innovadora y experta con total dedicación al sector de la fertilidad.

Fundamentados en la buena posición de mercado de estas cinco empresas, esta colaboración abre las puertas a una innovación constante, en línea con las técnicas más avanzadas y acorde a las necesidades de los clientes, mediante una oferta de soluciones personalizadas para procedimientos de reproducción asistida y un elevado nivel de formación y capacitación de respaldo.

Visite nuestro sitio web para obtener más información.

CONTROL DE CALIDAD | RECUPERACIÓN DE OVOCITOS | ANDROLOGÍA E INSEMINACIÓN INTRAUTERINA | FERTILIZACIÓN | CULTIVOS | PGD Y PGS | CRIOPRESERVACIÓN | TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

Origio Medicult España S.L
C/ Platón 6
08021 Barcelona, España
Tel: 93 199 81 18 o 93 199 81 19
Fax: 93 362 36 11
Correo electrónico: informacion@origio.com
www.origio.com

CooperSurgical Fertility Companies

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

APLICACIÓN ACTUAL DE LOS DIFERENTES SISTEMAS DE TIME LAPSE

Natalia Basile, PhD Instituto Valenciano de Infertilidad, Madrid

La tecnología time-lapse lleva aplicándose clínicamente unos 7 años en los centros de reproducción asistida. Entre los años 2010 y 2011 los primeros estudios se centraron en el descubrimiento de variables morfocinéticas que estuvieran asociadas, o no, a un embrión con mayor potencial reproductivo. Posteriormente, los algoritmos basados en estas variables fueron evaluados, de forma retrospectiva y prospectiva, con el fin de probar si la selección embrionaria a través de la morfocinética mejoraba o no los resultados clínicos en comparación con la morfología estática convencional. Los resultados han sido contradictorios.

Los equipos a su vez han ido evolucionando tanto en el diseño como en las propiedades de los hardware y software asociados. La tendencia es hacia equipos "all in one", cada vez más pequeños y en su preferencia automatizados, que combinen un buen sistema de incubación con la posibilidad de monitorización continua y la utilización de algoritmos a gusto del consumidor.

Dentro de las aplicaciones actuales de esta tecnología, una que es de particular interés, tiene que ver con su aplicación en pacientes destinados a diagnóstico genético pre-implantacional. Estudios recientes demuestran que esta tecnología nos podría ayudar no solo a conocer el comportamiento cinético de embriones aneuploides sino también el de embriones euploides que implantan versus los que no lo hacen. En nuestro reto por seleccionar un único embrión con el mayor potencial de implantación la combinación de ambas tecnologías resulta atractiva para el embriólogo.

METABOLOMICS, PROTEOMICS AND DNA MITOCHONDRIAL IN THE EMBRYO SELECTION

Thomas EBNER, Kepler University Linz, Austria
Department of Gynecology, Obstetrics, and Gynecological Endocrinology. Krankenhausstr. 26-30 A-4020 Linz, Austria.
Email:Thomas.ebner@kepleruniklinikum.at - Tel. +43 05 768084 24600 - Fax. +43 05 768084 24604

The goal of ART is the delivery of a healthy singleton child through the transfer of an individual - potentially euploid - embryo. The ultimate methods to investigate the implantation potential and health of in vitro grown embryos are invasive techniques (such as polar body, blastomere or trophectoderm biopsy). On the other hand, there are several non-invasive approaches which also have the potential to estimate the fate of an embryo. Mostly, simple morphology during preimplantation development is taken into consideration, however, more recently, particular timing and synchrony of cleavage events were annotated to further assist embryo selection (morphokinetics). In addition, cumulus cells - somatic cells that grow in the same follicular milieu as the female gametes - would reflect the potential of the latter. Last but not least, there is the chance to screen the culture medium in which embryos grow for diverse embryo-produced "products".

In detail, it is the term "-omics" that refers to the usage of high-throughput techniques that more or less simultaneously analyze changes in the genome (assessment of variability in DNA sequence in the genome), epigenome (epigenetic modifications of DNA), transcriptome (gene expression profiling, assessment of variability in composition and abundance of mRNA levels), proteome (variability in composition and abundance of the proteins) or metabolome (variability in composition and abundance of metabolites) in a biological sample (Altmae *et al.*, 2014).

This lecture is meant to deal with proteomics, metabolomics as well as with the diagnostic potential of mitochondrial DNA found in culture medium. Proteins and metabolites that are associated, either positively or negatively, with pregnancy outcome refer to the term "biomarker". Morphology/Morphokinetics are unfortunately not absolute and do not necessarily reflect the physiological

status of the blastocysts. It has been published that sibling embryos/ blastocysts of the same morphological grade can vary enormously in their proteomes (Katz-Jaffe *et al.*, 2006) and metabolic activity (Gardner *et al.*, 2001).The proteome, being derived from the transcriptome, consist of over a million proteins and its analysis requires cellular extraction, but it is feasible to analyse a large number of proteins and peptides secreted by an individual human embryo, the secretome, by sampling the surrounding culture medium (Gardner *et al.*, 2015).

The systematic study of unique chemical footprints of certain cellular processes (metabolomics) is able to characterize typically thousands of metabolites. Techniques such as RAMAN or "Near Infrared Spectroscopy" do not allow for quantification of specific nutrients. Studies using these techniques rather create a relative "Embryo Viability Score" which is thought to reflect embryo developmental potential. "Targeted Metabolomics", on the other hand, enables the clinical embryologists to identify one or several known metabolites used by the embryo. Examples of such compounds include glucose and lactate as well as amino acids (Gardner *et al.*, 2015).

The presence of cell-free nucleic acids (lncRNA, miRNA, cfDNA and mitDNA) in a drop of culture medium can also be used to predict the fate of an embryo or blastocyst. While all RNAs have a certain physiological role, cell-free DNA, irrespective whether it is genomic or mitochondrial one, is an artefact and usually of negative prognosis.

To date, embryologists try to correlate embryo metabolism and viability with morphologivcal and -kinetic data to create more robust algorithms for embryo selection. Microfluidic devices may offer the potential to be used in human IVF clinics for the routine diagnosis of embryo biomarkers.

eppendorf

Sus procesos en movimiento

Nuestros clientes - Nuestra contribución

Durante más de 70 años, las innovadoras tecnologías y los productos de alta gama de Eppendorf han hecho una contribución muy importante en la mejora de los procesos de trabajo en laboratorios y en unidades de investigación alrededor del mundo.

Los productos Eppendorf están diseñados para laboratorios de investigación académicos o comerciales, como por ejemplo en compañías farmacéuticas, biotecnológicas, químicas o alimentarias. También se usan en el análisis, la producción y el control de calidad en laboratorios clínicos, medioambientales, forenses u otras industrias.

www.eppendorf.com

Información de contacto:
Eppendorf Ibérica S.L.U. · Tel.: 91 651 76 94 · E-mail: eppendorf@eppendorf.es

* El micromanipulador TransferMan® 4m y los Microinyectores CellTram® 4m están registrados en la Unión Europea como dispositivos médicos (de acuerdo con la Directiva de Dispositivos Médicos 93/42/CEE).

Eppendorf® and The Eppendorf Brand Design are registered trademarks of Eppendorf AG, Hamburg, Germany. All rights reserved, incluing graphics and images. Copyright © 2017 by Eppendorf AG.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

VITRIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS

Raúl Sánchez1*, Mabel Schulz1, Pamela Uribe1, Jennie Risopatrón2, Rodrigo Sánchez3, Vladimir Isachenko4, Evgenia Isachenko4.
1Centro de Excelencia en Medicina Traslacional-BIOREN, Departamento de Ciencias Preclínicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. 2Centro de Excelencia en Biotecnología de la Reproducción-BIOREN, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. 3Facultad de Ciencias, Escuela de Medicina, Campus Temuco, Universidad Mayor, Chile
4Departamento de Obstetricia y Ginecología, Universidad de Colonia, Colonia, Alemania.
Raúl Sánchez Gutiérrez, Montevideo 0870, Temuco-Chile.
Email: raul.Sánchez@ufrontera.cl - Tel: 56 9 92283625

RESUMEN

La criopreservación de espermatozoides ha experimentado un cambio importante por la posibilidad de realizar los procedimientos de medicina reproductiva con gametos previamente criopreservados. Esto disminuye la presión emocional en los pacientes, como también el riesgo de hiperestimulación ovárica durante los procesos de fecundación in vitro, posibilitando la transferencia embrionaria en forma diferida. Asimismo, el desarrollo de técnicas cada vez más reproducibles y simples permite preservar los gametos con alta conservación de su función. Este impulso a la criopreservación se produce especialmente desde la vitrificación de ovocitos. Similar procedimiento se está realizando en los espermatozoides, que permite disminuir los efectos adversos asociados al proceso de congelación/descongelación, como pérdida de la función espermática. Esta se refleja en alteraciones de la membrana plasmática, daño a nivel mitocondrial, deterioro en la integridad del ADN, aumento en la producción de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/NOS) y alteraciones del citoesqueleto, lo que finalmente tiene efectos negativos en la viabilidad y motilidad espermática, elementos esenciales para la fecundación. La vitrificación de espermatozoide no solo ha permitido mejorar la función espermática, sino también que lo hace más rápido, seguro y de menor costo. Esto último al eliminar los equipos necesarios para la congelación lenta y en algunos casos la no utilización de nitrógeno líquido para el almacenamiento, reemplazándolo por un freezer de -80°C. Su aplicación ha sido exitosa en humanos con nacimientos de niños sanos, tanto en técnicas de fecundación in vitro como inseminación intrauterina.

PALABRAS CLAVES

Vitrificación, espermatozoides humanos, función espermática, criopreservación, preservación de fertilidad.

INTRODUCCIÓN

La preservación de fertilidad, se ha asociado a la conservación de la fertilidad en pacientes que deben recurrir a terapias médicas que generan daño irreversible del tejido gonadal, pero también comprende la preservación social de la fertilidad, que corresponde a quienes desean ser padres a edades más avanzadas (Muñoz *et al.*, 2016). Esto ha permitido evaluar técnicas que estaban especialmente diseñadas a una criopreservación tradicional de células en nitrógeno líquido y para el almacenamiento de semen. El desarrollo de la vitrificación como método de elección para la congelación de ovocitos y embriones, ha permitido contar con una técnica de fácil implementación, reproducible y con alta conservación de la función celular (Kuleshova*et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000¸ Kuwayama *et al.*, 2005). Este método ha sido evaluado para preservación de espermatozoides humanos, obteniéndose prometedores resultados, cambiando el concepto de banco de semen a banco de espermatozoides, ya que permite preservar al espermatozoide libre de plasma seminal, evitando la mayoría de las contaminaciones de este, ya sea parasitario, bacteriano o viral (Isachenko *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2012). Pero, su mayor importancia radica en que disminuye las alteraciones que sufren los espermatozoides en el proceso de congelación/descongelación, como es el daño en la membrana celular e incremento de los riesgos de fragmentación del ADN. Esto último se ha asociado a un incremento en las tasas de aborto, especialmente en fecundación *in vitro* (Agarwal *et al.*, 2016). Con la disminución del daño celular se obtiene un mayor número de células funcionales, permitiendo a pacientes con bajo recuento espermático, y que la única posibilidad era la fecundación *in vitro* con ICSI, acceder a una terapia de bajo costo como es la inseminación intrauterina, especialmente en países que estos procedimientos de Fecundación in vitro no son parte de los planes de salud pública. Asimismo, la vitrificación de espermatozoides es un método sencillo y fácil de reproducir, que podría ser aplicada en regiones donde se está incrementando el factor masculino como es África, Latinoamérica y países de Europa Oriental (Agarwal *et al.*, 2015). Aunque la etiología no es muy precisa, es posible, al igual como ocurrió en la mujer donde el mayor factor de infertilidad fueron las enfermedades de transmisión sexual que producían daño de la tuba uterina, que las infecciones seminales silentes más frecuentes en estas regiones contribuyan en parte a la disminución del recuento espermático (Cales *et al.*, 1985, Gimenes *et al.* 2014). La disminución de los costos es fundamental para expandir la aplicación de esta metodología, de ahí, que el uso de un medio de cultivo básico como el Buffer Fosfato Salino (PBS) suplementado con el suero del mismo sujeto, permita tanto preservar espermatozoides a pacientes oncológicos como para aquellos que necesiten tratamientos de fertilidad, especialmente en estos países donde la inseminación intrauterina es un procedimiento de bajo costo.

Esta revisión describe las técnicas más utilizadas en vitrificación de espermatozoides para preservar

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

espermatozoides, y especialmente en métodos de fecundación asistida e inseminación intrauterina.

VITRIFICACIÓN

La vitrificación es un método de criopreservación ultra rápida que consiste en la exposición directa de la célula en nitrógeno líquido o a sus vapores, evitando así la cristalización del agua intracelular (Albarracín, 2005).Uno de los principios en que se basa la vitrificación es que la solución vitrificante, lleva incorporado crioprotectores en alta concentración. La mezcla al ser enfriada no cristaliza, sino que se torna viscosa y pasa de líquido a un estado sólido no estructurado similar al vidrio, tomando de ahí su nombre (Fahy, 1984).

La ventaja de la vitrificación es que los espermatozoides, que a diferencia del ovocito, tiene escaso citoplasma, permite disminuir la concentración de crioprotectores y mantener leves rangos mayores de hiperosmolaridad, entre 320 a 420 mOsm. Esto permite disminuir el daño celular que ocurre durante el congelamiento lento y además se puede prescindir de equipos sofisticados de alto costo (Isachenko *et al.*, 2003). La mayoría de la investigación sobre vitrificación está dirigida hacia ovocitos y cigotos en etapas primarias de segmentación (Kuleshova *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000¸ Kuwayama *et al.*, 2005).

Los primeros ensayos de vitrificación realizados en espermatozoides no resultaron exitosos debido a la poca tolerancia de estos a las altas concentraciones de crioprotector (Isachenko *et al.*, 2003). Durante mucho tiempo, se han utilizado crioprotectores permeables en altas concentraciones para vitrificar espermatozoides, estos en la mayoría tienen carácter tóxico, produciendo daño osmótico a las célula, deterioro que se agudiza, considerando las características de tamaño y escaso citoplasma con el que cuentan los espermatozoides (Isachenko *et al.*, 2004). El protocolo de vitrificación que ha utilizado nuestro grupo de trabajo no considera crioprotectores permeables, sino impermeables en bajas concentraciones (sucrosa, trehalosa), es más inocuo y disminuye el daño celular al momento de la criopreservación. Este método hace posible obtener altos porcentajes de viabilidad y movilidad, como niveles reducidos de fragmentación de ADN, lo que posibilita el uso de estos espermatozoides en técnicas de reproducción asistida.

TIPOS DE VITRIFICACIÓN ESPERMÁTICA

VITRIFICACIÓN NO ASÉPTICA

Esta es la primera técnica que logra niveles adecuados de conservación de la función en espermatozoides humanos obtenidos después de selección espermática y que aplica la regla básica de este método, que es el contacto directo de las células con el nitrógeno líquido. Esta metodología libre del plasma seminal, permite eliminar detritus celulares, células muertas, leucocitos y microorganismos que son fuente de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y que dañan la membrana del espermatozoide (Isachenko *et al.*, 2008).

Descripción de la Técnica

1. Una vez realizada la selección espermática, las células están preparadas para adicionar la solución vitrificante (0.5 M de sucrosa disuelta en agua bidestilada) en relación volumen/volumen 1:1, quedando en una solución final de sucrosa 0.25M.

2. Se deja equilibrar la solución durante 5 min, y con una pipeta graduada se preparan alícuotas de 30 µl de solución espermática y son agregadas directamente en nitrógeno líquido formándose esferas sólidas (Figura 1).

3. Las esferas congeladas son depositadas en criotubos rotulados y almacenadas a –196ºC en nitrógeno líquido.

4. El proceso de desvitrificación se realiza en tubos Falcon conteniendo 3 ml de HTF-HSA 1% a 42ºC, depositándose las esferas de material congelado, agitando con vortex el tubo cada vez que una esfera es depositada dentro de éste. Se debe desvitrificar no más de 5 esferas por tubo para evitar el enfriamiento del medio.

Este método permite obtener un número adecuado de espermatozoides con función espermática conservado (Isachenko *et al.*, 2008), pero que no puede utilizarse en humanos por no ser aséptico, pero este método puede ser aplicarlo en otras especies de mamíferos (Sánchez *et al.*, 2010).

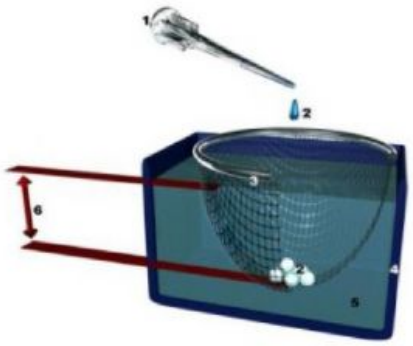


Figura 1. Método de vitrificación no aséptica. 1. Pipetas con volumen ajustable (30µL); 2.Suspensión de espermatozoides; 3. Rejilla; 4. Caja de la espuma; 5. Nitrógeno líquido; 6. Distancia mínima de 3 cm.

VITRIFICACIÓN ASÉPTICA

Debido a los riesgos de contaminación microbiológica que presenta el nitrógeno líquido no aséptico, es que se desarrollaron métodos que permiten que el medio con espermatozoides no entre en contacto directo con el nitrógeno. Los más utilizados son aquellos que utilizan pajuelas, ya sea única o bien una pajuela dentro de otra (Isachenko *et al.*, 2011). La vitrificación aséptica (V), utilizando sucrosa 0.25 M como crioprotector no permeable demostró preservar una mejor función espermática en comparación con la congelación lenta (CL). En los valores más sensibles como es la movilidad espermática luego de la desvitrificación fue de un 77,6 % significativamente superior a la congelación lenta con un 29,5 % en espermatozoides seleccionados libres de plasma seminal. Estas diferencias también

se encontraron en la protección de la membrana plasmática (54,3% V v/s 21,2 % CL), pérdida de la integridad de Membrana Acrosomal (28,0 ± 6,9% V v/s 41,4 ± 2,5% CL), translocación de la Fostatidilsereina con solo un 1,6% en comparación al 20,1% de la CL. En forma similar a estudios previos no se observó aumento en la Fragmentación de ADN de los espermatozoides en ninguno de los métodos de criopreservación.

Descripción de la Técnica

1. Una vez realizada la selección espermática, se realiza un recuento espermático en aquellas muestras > $1x10^6$ espermatozoides/ml las células son preparadas para la solución vitrificante, adicionando en relación volumen/volumen 1:1, 0.5 M de sucrosa disuelta en agua bidestilada quedando en una solución final de sucrosa 0.25M.

1a. Se colocan 100µL de solución (1.0 a 3.0 x 10^6 espermatozoides/mL) en pajuelas de 0.25 mL y se introduce en otra pajuela de 0.5 mL que es sellada con calor (Figura 2). Posteriormente, se sumergen las pajuelas en nitrógeno líquido por 5 segundos, y se guardan en el porta pajuelas y se pueden almacenar ya sea en nitrógeno líquido como en freezer a -80ºC para su conservación (Figura 3) (Sánchez *et al.*, 2012).

2. En aquellas muestras < $1x10^6$ espermatozoides/ml, los espermatozoides seleccionados se centrifugan a 300g por 8 minutos, se elimina el sobrenadante y al pellet se agrega la solución vitrificante (Para 1 mL de Solución Vitrificante; Medio de Cultivo: 0,495 mL; Solución de sucrosa 0.5M (MP Biomedicals, Cat. 152584) disuelta en Agua bidestilada: 0,495 mL y Dextran Serum Supplement (Irvine Scientific, cat.9301): 0,010 mL), se mezcla y de inmediato se llenan las pajuelas con 100µL de solución.

2a. El volumen adicionado requerido es según la técnica a realizar y la concentración final de espermatozoides, se sugiere para inseminación intrauterina o fecundación *in vitro* 100 µL y para ICSI 30 µL. Para ICSI colocar gotas de 10 µL en un extremo de la pajuela de 0.25 mL.

Las pajuelas de 0.25ml se introducen en otra pajuela de 0.5ml que es sellada con calor y se sumergen las pajuelas

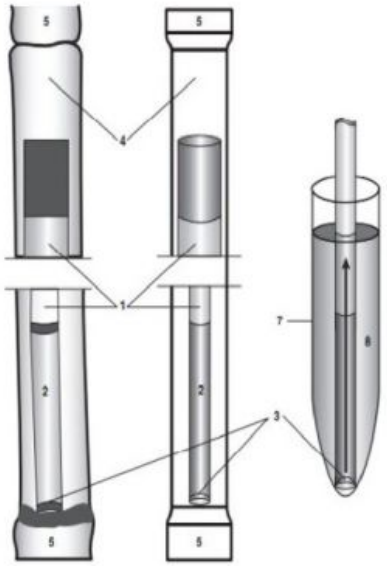


Figura 2. Método de vitrificación aséptica. 1. Pajuela Interna de 0.25 ml, llenada con 100µL de medio; 2. Suspensión de espermatozoides; 3. Menisco de suspensión; 4. Pajuela de 0.5 mL; 5. Sellado con calor; 6. Marca sobre la pajuela; 7. Tubo para descongelar; 8. Medio de descongelación

en nitrógeno por 5 segundos, y posteriormente son almacenadas.

DESVITRIFICACIÓN ESPERMÁTICA

Esta etapa es complementaria a la vitrificación, ya que este proceso si se realiza en forma gradual también puede generar criolesión que resulta de la desvitrificación de la solución intracelular, con la formación de nuevos núcleos de hielo o crecimiento de los cristales existentes en el citosol y al ablandamiento de la matriz vítrea de la célula solidificada (Karlsson, 2001). A bajas tasas de calentamiento, la cristalización es completa, ya que existe un tiempo promedio en el cual se produce un movimiento de moléculas de agua u otros solutos, facilitando la formación de cristales de hielo, de forma intra y extracelular. Este fenómeno podría reducirse significativamente al aumentar la tasa de calentamiento durante la desvitrificación. Nuestros estudios se dirigieron a incrementar la velocidad de desvitrificación, aumentando la temperatura del medio desde 38ºC, 40ºC y 42ºC, evaluando motilidad por el sistema de CASA y la función de la membrana de espermatozoides mediante la prueba de HOST. La motilidad progresiva aumentó significativamente con 42°C respecto a las otras temperaturas, como asimismo, la conservación de la función de la membrana plasmática con 76,3 ± 2,0% a 42 ° C en comparación con 40 ° C (43 ± 2%) y 38 ° C (65,6 ± 1,5%) (Mansilla *et al.*, 2016).

Técnica de desvitrificación

1. Llenar un contenedor pequeño con nitrógeno líquido y colocar dentro las pajuelas que se desea desvitrificar.

2. Para aquellas muestras > $1x10^6$ espermatozoides/ml: Mantener un block calefactor o baño de agua a 42ºC conteniendo los tubos falcon con 2-3 mL de solución de desvitrificación (utilizar 1 tubo por cada 3 pajuelas). (Para 1 mL de Solución Desvitrificante; Medio de Cultivo: 0,990 mL, Dextran Serum Supplement (IrvineScientific, cat.9301): 0,010 mL),

3. Utilizando pinzas recuperar una pajuela del contenedor de nitrógeno, cortar la pajuela de 0.5 mL en el lugar donde se observa el extremo marcado y por inversión dejar caer sobre el medio de desvitrificación la pajuela de 0.25 mL. Con la ayuda de una pinza estéril, mover la pajuela para acelerar el proceso.

4. Centrifugar a 1800 rpm durante 5 minutos para concentrar y eliminar el sobrenadante. Agregar el volumen de medio para espermatozoides según la técnica a utilizar y concentración espermática (0.3 a 0.4 mL para inseminación intrauterina, 10 a 100 µL para técnicas de FIV).

5. Para aquellas muestras que contengan < de $1x10^6$ espermatozoides/ml: Cortar la pajuela de 0.5 mL en el lugar donde se observa el extremo marcado y

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

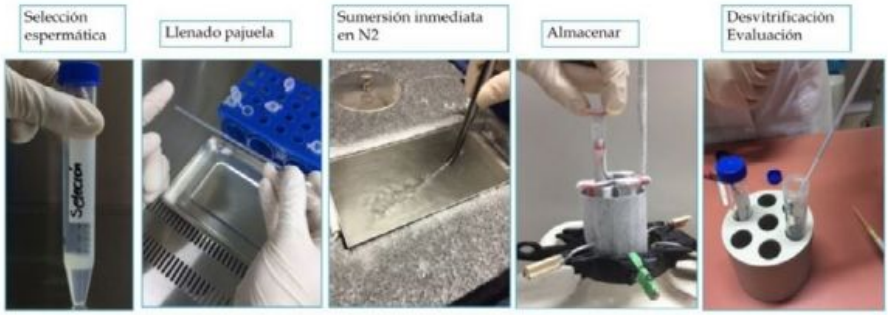


Figura 3. Proceso de vitrificación aséptica

por inversión dejar salir la pajuela y colocar directamente el extremo con la gota de 10 µL en la solución para microinyección a 40°C.

NUEVAS PERSPECTIVAS DEL USO DE VITRIFICACIÓN PARA INSEMINACIÓN INTRAUTERINA

El incremento del factor masculino, que por primera vez es mayor al 50%, sobrepasando al factor femenino, es un problema emergente en los países en vías de desarrollo (Agarwal *et al.*, 2015). Esto plantea un nuevo desafió tanto en el diagnóstico, como en las alternativas terapéuticas. Debido a que la alternativa terapéutica principal al factor masculino severo de diferentes etiologías, es la Inyección intracitoplasmatica de gametos, pero que por su elevado costo aun está restringido a un número muy reducido de la población, especialmente en los países en vías de desarrollado, la vitrificación al hacer posible la acumulación de espermatozoides para contar con un numero > de un millón/mL permite entregar una alternativa posible a estos pacientes (Sánchez *et al.*, 2013). Con este objetivo, evaluamos como preservar adecuadamente los espermatozoides previo a la inseminación intrauterina, considerando el tiempo que ocurre desde la desvitrificación hasta que un profesional esté disponible para hacer el procedimiento, debido a la alta demanda de estos en los países con limitados recursos, como asimismo determinar el uso de otros disacáridos que mantengan una adecuada viabilidad y motilidad en el tiempo. La primera evaluación fue determinar el tiempo y las condiciones que estas células deben mantenerse antes del procedimiento. Los espermatozoides postdesvitrificación fueron mantenidos hasta 6 horas a temperatura ambiente (20°C) o en estufa de cultivo a 37°C. Aunque existe una disminución leve de la motilidad en ambas temperaturas, la viabilidad espermática fue significativamente mayor a temperatura ambiente y no hubo cambios en la externalización de la fosfatidilserina proceso asociado a la capacitación espermática (Figura 4). Por tanto, las células pueden mantenerse a temperatura ambiente hasta por un periodo de 6 horas.

Asociado a este proceso, está la conservación de la motilidad en el tiempo, para ello comparamos dos disacáridos, utilizados habitualmente en los proceso de criopreservación que es sucrosa y trehalosa (Schulz *et al.*, 2017). Además, se evaluó la integridad de membrana plasmática e integridad del ADN por un periodo de 12 horas. Se utilizó la concentración habitual de sucrosa 0,25 M y trehalosa 0,05 M (concentración final). Trehalosa 0,05 M mantuvo significativamente una mayor motilidad al tiempo 0, 6 y 12 horas en comparación a sacarosa 0,25 M. La integridad de membrana fue mejor conservada al tiempo 0 por trehalosa 0,05 M, pero no hubo significancia a las 6 y 12 horas. Asimismo, trehalosa a las 6 horas preserva significativamente una mayor integridad del ADN (> 95% de los espermatozoides) (Figura 5). Estos resultados permiten sugerir que aquellas técnicas de fecundación asistida que requieran espermatozoides con motilidad conservada e integridad de su función por un mayor número de horas, se recomienda utilizar trehalosa 0,05 M en la vitrificación espermática.

No obstante, todo lo realizado para simplificar la metodología podría no tener aplicación práctica si no hay una reducción ostensible de los costos, debido que tanto los medios de congelación lenta como los de vitrificación superan los 100 dólares.

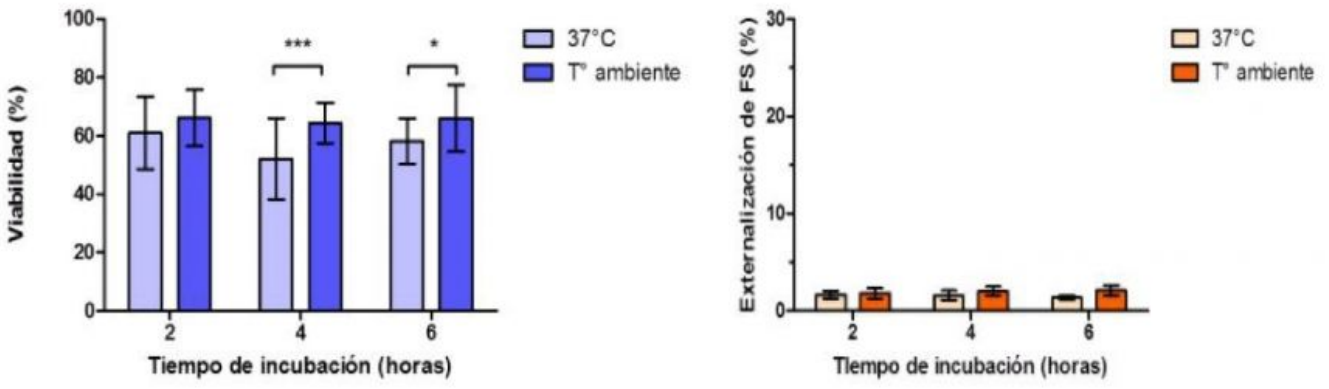


Figura 4. Evaluación de la temperatura en la mantención de la vitalidad y función espermática posterior a la desvitrificación

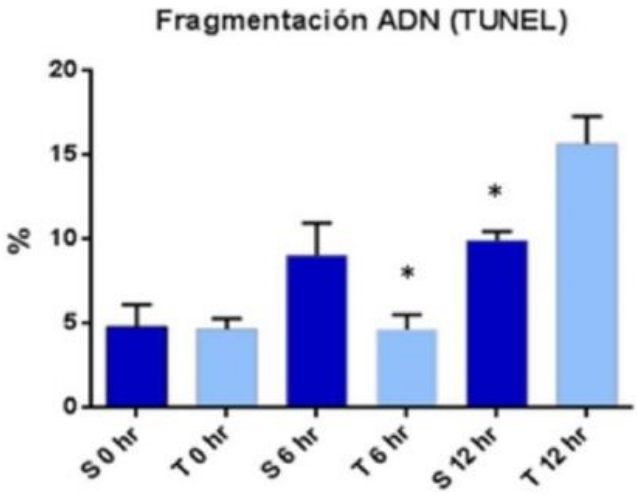


Figura 5. Efecto protector de Trehalosa sobre la fragmentación del ADN en espermatozoides desvitrificados

De ahí, que realizamos un protocolo que incluyera el medio más básico para la mantención in vitro de células, que es el PBS y se reemplazó el dextran por suero inactivado del propio paciente. Finalmente, la fórmula de vitrificación con PBS suplementado con sucrosa 0.25 M y suero inactivado al 5% concentración final, permite mantener tanto la motilidad postdesvitrificación sobre un 60% y la función espermática. El costo de este medio es de 1 dólar los 100 mL, esto genera la posibilidad de mantener un banco de espermatozoides en cualquier complejo hospitalario, especialmente en los países con bajos niveles de ingresos per cápita.

ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

La forma de almacenamiento de las muestras es cada vez más importante, ya que el uso del nitrógeno líquido requiere de grandes espacios, tanto para preservar las muestras como para su manipulación y en especial el uso y almacenamiento de este que no está ajeno a riesgos, que van desde la quemaduras a asfixias graves. Este conjunto de situaciones hace que el costo de su uso sea elevado y restrinja la incorporación masiva de estas técnicas para la preservación de espermatozoides.

Al estar los espermatozoides vitrificados con sustancias no permeables, disminuye la posibilidad de agua dentro de la célula, esto permite un almacenaje a temperaturas menores. La evaluación del almacenamiento a -80ºC (frezer) y a -180ºC (nitrógeno líquido) demostró que los espermatozoides vitrificados conservaron intacta su función evaluados a través de la motilidad, potencial de membrana mitocondrial y fragmentación del ADN en ambas temperaturas (Sánchez *et al.*, 2012). Esto simplificará en un futuro el almacenamiento de muestras, reduciendo los costos, el espacio, un menor tiempo y esfuerzo para encontrarlas y es más seguro para el operador. No obstante, en el caso de espermatozoides vitrificados en medio PBS los resultados son mejores con almacenamiento en nitrógeno líquido en comparación con -80°C.

CONCLUSIONES

La vitrificación es un método que conserva íntegra la funcionalidad espermática, obteniéndose un alto porcentaje de espermatozoides motiles con función mitocondrial y ADN intactos.

La vitrificación protege al espermatozoide de la criocapacitación con mínima translocación de fosfatidilserina comparado con la congelación.

La vitrificación es una técnica metodológicamente simple de implementar y menos laboriosa que la congelación. Se suma a ello la introducción de pajuelas selladas que evitan el contacto de los espermatozoides con el nitrógeno líquido, por lo cual es una técnica completamente aséptica, generando un nuevo concepto que es el cambio de los bancos de semen a bancos de espermatozoides.

El espermatozoide libre de plasma seminal con función conservada puede ser utilizado de inmediato para cualquier técnica de medicina reproductiva, minimizando los daños generados por la centrifugación y las horas de cultivo, ambos procesos dañinos para la célula, ya que producen una alta concentración de ROS y posible daño al ADN.

La temperatura óptima para el proceso de desvitrificación es 42°C que conlleva a una disminución de daño de membrana plasmática y acrosomal.

Los espermatozoides vitrificados conservan su función a temperaturas de - 86 ºC, esto simplifica el almacenamiento de muestras, reduciendo el espacio, un menor tiempo y esfuerzo para encontrar las muestras almacenadas y más seguro para el operador.

La no utilización de equipamiento tanto para una congelación gradual como estufas de cultivo para mantener las muestras a 37° y la utilización de PBS en el medio de vitrificación conlleva a una disminución de los costos, especialmente para centros dedicados a la preservación de fertilidad.

En pacientes con oligoastenozospermia, les permite ir colectando muestras para ciclos de inseminación intrauterina, antes de iniciar directamente una ICSI, esto genera la posibilidad de su utilización en el cualquier centro hospitalario en los países en vías de desarrollo.

AGRADECIMIENTOS

A la Asociación ASEBIR por su invitación que permite difundir investigación traslacional en Medicina Reproductiva. Pamela Uribe es becario CONICYT-Gobierno de Chile a través de su programa PAI N°79160030.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view

on male infertility around the globe. Reproduction Biology and Endocrinology 2015;13:37. doi: 10.1186/s12958-015-0032-1.

Agarwal A, Majzoub A, Esteves SC, Ko E, Ramasamy R, Zini A. Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios. Translation Andrology and Urology 2016; 5:935-950.

Albarracín L. Vitrificación de ovocitos bovino mediante la técnica *open pulledstraw:* Estudio estructural de cromosomas, microtúbulos y microfilamentos y posterior desarrollo embrionario in Vitro. Tesis doctoral. 2005; Facultad de Veterinaria Universidad Autónoma de Barcelona. España.

Cates W, Farley TM, Rowe PJ. Worldwide patterns of infertility: is Africa different? Lancet. 1985; 2:596-8.

Chen S, Lien U, Chao Y, Lu K, Ho H, Yang Y. Cryopreservation of mature human oocytes by vitrification with ethylene glycol in straws. Fertility and Sterility 2000; 74:804-808.

Fahy G, Mac Farlene D, Angell C, Meryman H. Vitrification as an aproach to cryoconservation. Cryobiology 1984; 21:407-426.

Gimenes F, Souza RP, Bento JC, Teixeira JJ, Maria-Engler SS, Bonini MG, Consolaro ME. Male infertility: a public health issue caused by sexually transmitted pathogens. Nat Rev Urol. 2014; 11:672-87.

Isachenko E, Isachenko V, Katkov I, Dessole S, Nawroth F. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. Reproductive BioMedicine Online 2003; 6:191-200

Isachenko E, Isachenko V, Katkov I, Rahimi G, Schöndorf T, Mallmann P, Dessole S, Nawroth F. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. Human Reproduction 2004; 19:932-939.

Isachenko E, Isachenko V, Katkow I, Lulat A, Schulz M, Risopatrón J, Weiss J, Sánchez R. Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose. Reproduction 2008; 136:167-173.

Isachenko V, Maettner R, Petrunkina A, Mallmann P, Rahimi G, Sterzik K, Sánchez, R, Risopatron J, Damjanoski I, Isaschenko E. Cryoprotectant-Free Vitrification of Human Spermatozoa in Large (to 0.5 mL) Volume: Novel Technology. Clinical Laboratory 2011; 57:643-650.

Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes. Human Reproduction 1999; 14:3077-3079.

Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo S. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. Reproductive BioMedicine Online 2005; 11:300-308.

Liu J, Tanrikut C, Wright DL, Lee GY, Toner M, Biggers JD, Toth TL. Cryopreservation of human spermatozoa with minimal non-permeable cryoprotectant. Cryobiology 2016; 73:162-7.

Mansilla M, Merino O, Risopatrón J, Isachenko V, Isachenko E, Sánchez R. High temperature is essential for preserved human sperm function during the devitrification process. Andrologia 2016; 48:111-3.

Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. American Journal of Physiology 1984; 247:C1125-1142.

Muñoz M, Santaballa A, Seguí MA, Beato C, de la Cruz S, Espinosa J, Fonseca PJ, Perez J, Quintanar T, Blasco A. SEOM Clinical Guideline of fertility preservation and reproduction in cancer patients. Clinical and Translational Oncology 2016; 18:1229-1236.

Sánchez R, Risopatrón J, Schulz M, Villegas J, Kreienberg R, Isachenko V, Isachenko E. Canine sperm vitrification with sucrose: Effect on sperm function. Andrologia 2010; 43:114-120.

Sánchez R, Risopatron J, Schulz M, Villegas J, Isachenko V, Isachenko E. Vitrified spem banks: the new aseptic technique for human spermatozoa allows cryopreservation at -86ºC. Andrologia 2012; 44:433-435.

Sánchez R, Schulz M, Risopatron J, Isachenko V, Isachenko E. Vitrificación de espermatozoides: una alternativa a la inyección intracitoplasmatica de espermatozoides en paciente con oligoastenozoospérmia severa. Revista Internacional de Andrologia 2013; 11:36-39.

Schulz M, Risopatrón J, Matus G, Pineda E, Rojas C, Isachenko V, Isachenko E, Sánchez R. Trehalose sustains a higher post-thawsperm motility than sucrose in vitrified human sperm. Andrologia 2017; doi: 10.1111/and.12757.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

VITRIFICACIÓN VS CONGELACIÓN. ESTUDIO CELULAR E INICIOS DE LA APLICACIÓN CLÍNICA

Llanos Medrano [a,b,c], Maria Jose Gómez-Torres [b,c], Andrea Leza [a,b], Belén Ramos [a,b], María Enciso [d], Jonás Sarasa [d], Jon Aizpurua [a,b]
[a] IVF SPAIN, Alicante, España; [b] Cátedra Human Fertility, Universidad de Alicante, España; [c] Departamento de Biotecnología, Universidad de Alicante, España; [d] IGLS, Alicante, España
Email: ll.medrano@ivf-spain.com - Tel: 965267890

INTRODUCCIÓN, MATERIAL Y MÉTODOS

La criopreservación de gametos humanos y embriones es un proceso esencial entre las técnicas de reproducción asistida. La preservación de espermatozoides es particularmente importante para salvaguardar la fertilidad masculina y/o garantizar la disponibilidad de espermatozoides en el momento de la fecundación (Fabbri et al., 2004). En la actualidad, la congelación lenta es la técnica más usada para la criopreservación espermática (Mocé et al., 2016). Este método se basa en un enfriamiento espermático progresivo y en el uso de crioprotectores permeables y no permeables. Está ampliamente demostrado que los protocolos de congelación lenta producen daños tóxicos y osmóticos (Morris, 2006; Ozkavukcu et al., 2008) que se relacionan con la adición y retirada de crioprotectores y/o la formación de cristales de hielo, provocando alteraciones y cambios en el espermatozoide, tanto a nivel estructural como funcional (O'Connell et al., 2002; Isachenko et al., 2004; Desrosiers et al., 2006).

Estas desventajas han dado lugar, en los últimos años, a la búsqueda de métodos alternativos para mejorar la preservación de muestras de espermatozoides (Slabbert et al., 2015). Uno de los métodos de criopreservación más innovadores es la vitrificación. Esta técnica se basa en un aumento y descenso de temperatura ultra-rápidos sin el uso de crioprotectores permeables. Durante este proceso, el agua se enfría hasta un estado vítreo, de alta viscosidad, sin que se produzca cristalización de hielo intracelular, haciéndola más rápida y presumiblemente más segura respecto a la tradicional congelación lenta (Katkov et al., 2006).

Las mejoras aportadas por la vitrificación ya se han demostrado en otros tipos celulares, como ovocitos y embriones (Rienzi et al., 2016). A pesar de ello, la vitrificación espermática es todavía una metodología poco explorada y con un limitado número de estudios que muestren su eficacia en el gameto masculino.

Durante los últimos años, se han publicado diferentes protocolos desarrollados la mayoría de ellos por Isachenko y colaboradores. En 2002, este grupo describió el primer protocolo sin el uso de crioprotectores (Nawroth et al., 2002). Tras esa primera publicación, han publicado alternativas al protocolo inicial utilizando, además de diferentes medios, diferentes soportes y volúmenes variables pero siempre menores de 0,5ml (Isachenko et al., 2008, 2012a, 2012b; Zou et al., 2013). A pesar de que el grupo de Isachenko ha publicado varios nacimientos mediante el uso de esta técnica (Isachenko et al., 2012a; Sánchez et al., 2013), hasta ahora, la vitrificación de espermatozoides no se ha implementado en la rutina diaria de los laboratorios de FIV.

Con el objetivo de buscar un método alternativo a la congelación de espermatozoides en el laboratorio de FIV, se propuso un estudio en dos fases: en la primera fase (F1) se realizó una evaluación del rendimiento de un nuevo protocolo de vitrificación en muestra espermática completa libre de crioprotectores permeables en un soporte de almacenamiento de mayor volumen al publicado en la literatura hasta la fecha frente a la congelación. La segunda fase (F2), iniciada recientemente, es un estudio prospectivo del rendimiento de ambas técnicas en ciclos de fecundación in vitro.

Para la primera fase se estudiaron 18 muestras espermáticas procedentes de pacientes sanos con diagnóstico de normozoospermia que acudieron a nuestro centro (IVF SPAIN ALICANTE, Alicante, España) para un tratamiento de reproducción asistida. Las muestras fueron obtenidas tras 1-3 días de abstinencia.

El análisis básico de la muestra seminal (concentración, motilidad y morfología) se realizó de acuerdo con las directrices de la organización mundial de la salud (OMS) (WHO, 2010). La media de recuento y volumen (media ± SEM) fue 83,44±13,73 mill/ml y 3,79±2,41ml, respectivamente

Cada muestra se dividió en 3 alícuotas para su análisis en fresco (F), tras la congelación/descongelación (S) y tras la vitrificación/desvitrificación (V).

La congelación de cada muestra se llevó a cabo usando Sperm cryoprotect™ II con glicerol (Nidacon, Mölndal, Suiza) siguiendo las indicaciones del fabricante. La mezcla se almacenó en criotubos de 1,8ml (NuncCryotubes®, Brand Products, Roskilde, Dinamarca) durante al menos 10 días en tanque de nitrógeno líquido. La descongelación se realizó a temperatura ambiente (30 min). El crioprotector se lavó usando medio de lavado (PureSperm®, Nidacon, Mölndal, Suiza) y centrifugación (300g, 10 min). Las muestras se resuspendieron finalmente en 300 µl de medio de lavado.

Para la vitrificación espermática se usó el kit Easy-Sperm® (V1, V2; iGLS, Alicante, España). Se añadió el medio de vitrificación (V1) a las muestras seminales a una dilución 1:1 y se incubó durante 5 min a 37ºC. Tras ello, la mezcla fue añadiéndose gota a gota (20 µl) en nitrógeno líquido, formándose

esferas sólidas que se almacenaron en los criotubos de 1,8 ml. Se almacenaron durante al menos 10 días en tanques de nitrógeno líquido. La desvitrificación se llevó a cabo añadiendo las esferas a 4ml de medio V2. Tras 5 min a 37ºC la muestra se centrifugó (300g, 10 min) y se resuspendió en 300 µl de medio de lavado.

En la F1 se realizó una evaluación de los parámetros seminales básicos en los tres grupos de estudio (F, S, V), siguiendo las indicaciones de la OMS (WHO, 2010). La morfología espermática se evaluó en 200 espermatozoides por muestra usando el criterio estricto de Kruger (Kruger *et al.*, 1987) subdividiéndose los daños en: cabeza (HD), pieza intermedia (MdD), gota citoplasmática (CD) y cola (TD) (WHO, 2010). La vitalidad espermática se evaluó (200 espermatozoides por muestra) usando el colorante *Sperm VitalStain*™ (Nidacon, Mölndal,Suiza).

La reacción acrosómica espontánea se evaluó usando el la lectina *Pisum sativum* conjugada con FITC (FITC-PSA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) siguiendo el protocolo descrito por Lybaert (Lybaert *et al.*, 2009). Se evaluaron por muestra un mínimo de 200 espermatozoides usando el microscopio de fluorescencia LEICA DMRB (100x y aceite de inmersión).

La evaluación de la fragmentación se llevó a cabo usando el Kit TUNEL (*In Situ* Cell Death Detection Kit, Roche, Mannheim, Alemania). Se evaluaron 200 espermatozoides mediante microscopía de fluorescencia LEICA DMRB (100x y aceite de inmersión).

Para la evaluación de la ultraestructura espermática mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), las muestras se fijaron y procesaron basándonos en un trabajo previo de nuestro grupo (Gómez-Torres *et al*, 2014).

Para la evaluación del citoesqueleto se siguió el protocolo publicado por Fouquet (Fouquet *et al.*, 1996); se empleó anticuerpo monoclonal anti α-tubulina producido en ratón (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) y como anticuerpo secundario DyLight 488 IgG anti-ratón (Jackson Inmuno Laboratories, West Grove, EEUU). Un mínimo de 200 espermatozoides por muestra fueron evaluados usándose el microscopio de fluorescencia LEICA DMRB (100x y aceite de inmersión).

En la F2 hasta el momento se han incluido 7 parejas que acudieron a la clínica IVF SPAIN ALICANTE (Alicante) para someterse a un tratamiento de ovodonación. Las muestras seminales se diagnosticaron como normozoospérmicas y, tras consentimiento informado, se dividieron en dos alícuotas: una para congelación y otra para vitrificación. La estimulación de las donantes se llevó a cabo mediante protocolo con antagonista de la GnRH con hormona recombinante estimuladora del folículo (250 IU. *Puregon*®; MSD, Ballerup, Denmark). El agonista de la GnRH utilizado fue *Orgalutran*® 0.25mg (MSD, Ballerup, Denmark). La inducción de la ovulación se realizó mediante Procrin 0,2 (Abbott, Madrid, España). La punción ovocitaria se llevó a cabo 36 horas después de la inducción. Las muestras seminales se descongelaron y desvitrificaron el día correspondiente a la punción de la donante asignada y preparadas mediante gradiente de densidad (40-80%; *PureSperm*® 100, Nidacon, Möndal, Suecia) y *swim up* en *Multipurpose Handling Medium*® (Irvine Scientific, California, EEUU). Los ovocitos obtenidos se decumularon combinando protocolo enzimático con hialuronidasa GM501 (Gynemed, Lensahn, Germany) y mecánico. La mitad de los ovocitos maduros se fecundaron mediante semen congelado y la otra mitad mediante semen vitrificado. La fecundación se observó a las 17±1h tras microinyección (ICSI). El cultivo se llevó a cabo en medio de cultivo continuo (*Continuous Single Culture*®, Irvine Scientific, Waalwijk,Paises Bajos) hasta día 6 en incubador *benchtop* (GERI®, Merck Fertility, Darmstadt, Alemania) valorando los embriones en estado de blastocisto (Balaban *et al.*, 2011). Se comparó la tasa de fecundación (% de ovocitos fecundados vs ovocitos donados), blastocisto útil (% blastocisto con objetivo reproductivo vs ovocitos fecundados), blastocisto de buena calidad (% blastocisto cuya

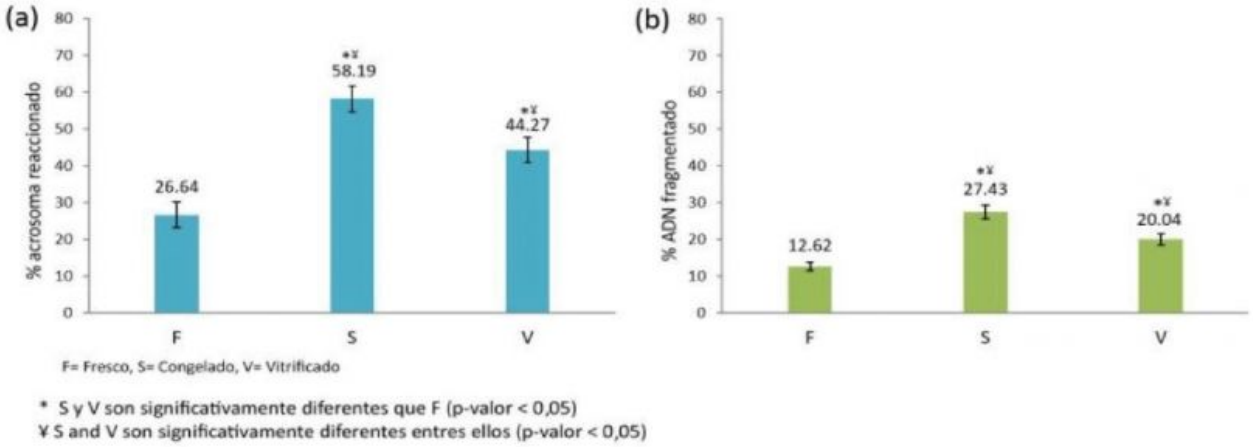


Figura 1: Impacto de la congelación lenta y la vitrificación sobre el acrosoma y el ADN. (a) Frecuencia de la reacción acrosómica espontánea. (b) Frecuencia de la fragmentación del ADN.

Parametro	Fresco (F)	Congelado (S)	Vitrificado (V)
Motilidad progresiva (%)	47,67±4,08	11,33±2,70*,▼	18,17±2,70*,▼
Morfología normal (%)	28,10±1,48	16,35±1,77*,▼	22,24±1,14*,▼
Daño cabeza (%)	44,83±3,05	53,03±3,77	47,88±2,87
Daño pieza intermedia (%)	15,82±1,28	16,02±2,00	17,92±4,13
Gota citoplasmática (%)	3,12±0,44	1,76±0,38	3,49±1,71
Daño cola (%)	25,98±2,94	51,62±3,38*,▼	36,88±3,11*,▼
Vitalidad (%)	87,75±1,66	55,13±4,79*	76,38±1,53

* Grupos (S y V) son significativamente diferentes al control (F), (p valor < 0,05). * Grupos de estudio(S y V) son significativamente diferentes entre ellos (p-valor < 0,05)

Tabla I. Parámetros seminales convencionales (media ± SEM) para fresco (F), congelado (S) and vitrificado (V).

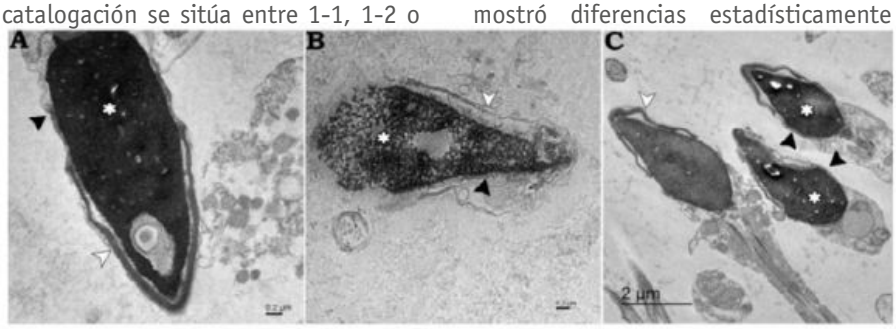


Figura 2: Microfotografías correspondientes a los grupos de estudio. A: Fresco; B: Congelado; C: Vitrificado.

catalogación se sitúa entre 1-1, 1-2 o 2-1 (Balaban *et al.*, 2011) vs blastocisto útil), tasa de blastocisto útil con predicción High (H), Medium (Md) y Low (L) (tasa de blastocisto H/Md/L vs blastocisto útil). Para catalogar H, Md y L se siguió los tiempos de división indicados en el artículo de Vermilyea (VerMilyea *et al.*, 2014).

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante SPSS v22.0 (IBM, Nueva York, EEUU). En la F1 se consideró un p-valor<0,05 como estadísticamente significativo. El test de ANOVA o de Friedman fueron utilizados para estudiar las diferencias significativas. Se realizó un análisis post hoc y una prueba de rangos con signo de Wilcoxon con corrección de Bonferroni para comparar las muestras relacionadas. En la F2 se realizaron análisis de estadísticos descriptivos.

RESULTADOS

En la F1, la comparación de los resultados obtenidos tras la congelación tradicional y la vitrificación mostró diferencias estadísticamente significativas en cada uno de los parámetros analizados.

Respecto a los parámetros convencionales, la motilidad y vitalidad mostraron un descenso en ambos métodos de criopreservación frente a la muestra en fresco (ANOVA, p<0,05) (Tabla I), siendo significativamente más acusado (ANOVA, p<0,05) en el grupo S (36,34% y 32,13 respectivamente) frente a V (29,5% y 11,37% respectivamente).

En lo que respecta a la morfología espermática, se observó la misma tendencia, reducción del porcentaje de formas normales tras la criopreservación por ambos métodos frente a la muestra control (F) (Test de Friedman, p<0,05) (Tabla I), pero significativamente más conservada tras el proceso de vitrificación que de congelación (Test de Friedman, p<0,05). El análisis de las anormalidades morfológicas mostró un aumento significativo de los daños en cola en el grupo S en comparación con V (Test de Friedman, p<0,05), pero no en el resto de estructuras evaluadas.

La evaluación del daño acrosomal y de la integridad del ADN a través del estudio de la reacción acrosómica espontánea y de la fragmentación del ADN respectivamente, mostraron un aumento significativo de ambos parámetros en ambos métodos de criopreservación frente al control en fresco (Test de Friedman, p<0,05; ANOVA, p<0,05, respectivamente) (Figura 1a y b). Siendo significativamente mayor el daño del acrosoma y del genoma espermático tras el protocolo de congelación lenta que tras la vitrificación (Test de Friedman, p<0,005; ANOVA, p<0,01 respectivamente)

Cuando se analizó la ultraestructura espermática, mediante microfotografías electrónicas para conocer los daños celulares tras la criopreservación, se observaron los siguientes hallazgos: en la figura 2.A, perteneciente un corte longitudinal de un espermatozoide en fresco, se observa integridad de la membrana plasmática, en la membrana del acrosoma y una condensación normal del núcleo (punta de flecha negra, blanca y asterisco respectivamente). La figura 2.B representa una microfotografía de la cabeza espermática en sección longitudinal, donde se puede apreciar la rotura de la membrana plasmática y la vesícula acrosomal dañada. En ambas estructuras se observan fenestraciones debido al daño producido por el proceso de congelación (puntas de flecha negra y blanca). Además, a nivel del núcleo, se observa una falta de compactación del ADN evidente (asterisco). En la figura 2.C la microfotografía de MET muestra tres cabezas espermáticas tras el proceso de vitrificación. En estas células los daños a nivel de membrana y acrosoma parecen menos acusados (punta de flecha negra y blanca); además el estado de la cromatina es aparentemente normal en los dos espermatozoides superiores (asterisco). En todas las muestras analizadas, el porcentaje de espermatozoides analizados con daños ultraestructurales fue menor en el grupo V en comparación con los observados en el grupo C, en los que además, los daños siempre afectaron a varias estructuras espermáticas como se ha reflejado en la figura 2.

El análisis del citoesqueleto a través de la α-tubulina mostró 3 patrones diferentes: i) Patrón total, el inmunomarcaje se observa en toda

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

Parámetro	Congelación	Vitrificación
Tasa fecundación	75,49 ± 16,13	78,37±12,35
Tasa blastocisto útil	37,02 ± 21,83	56,19 ±20,85
Tasa blastocisto buena calidad	54,71 ± 45,89	73,71 ± 40,70
Tasa blastocisto High	46,67 ± 44,72	72,22 ± 32,77
Tasa blastocisto Medium	43,33 ± 36,51	16,67 ±27,88
Tasa blastocisto Low	10,00 ± 22,36	11,11 ±27,21

Tabla II. Resultados preliminares fase II, aplicación laboratorio de FIV (Media ± SD)

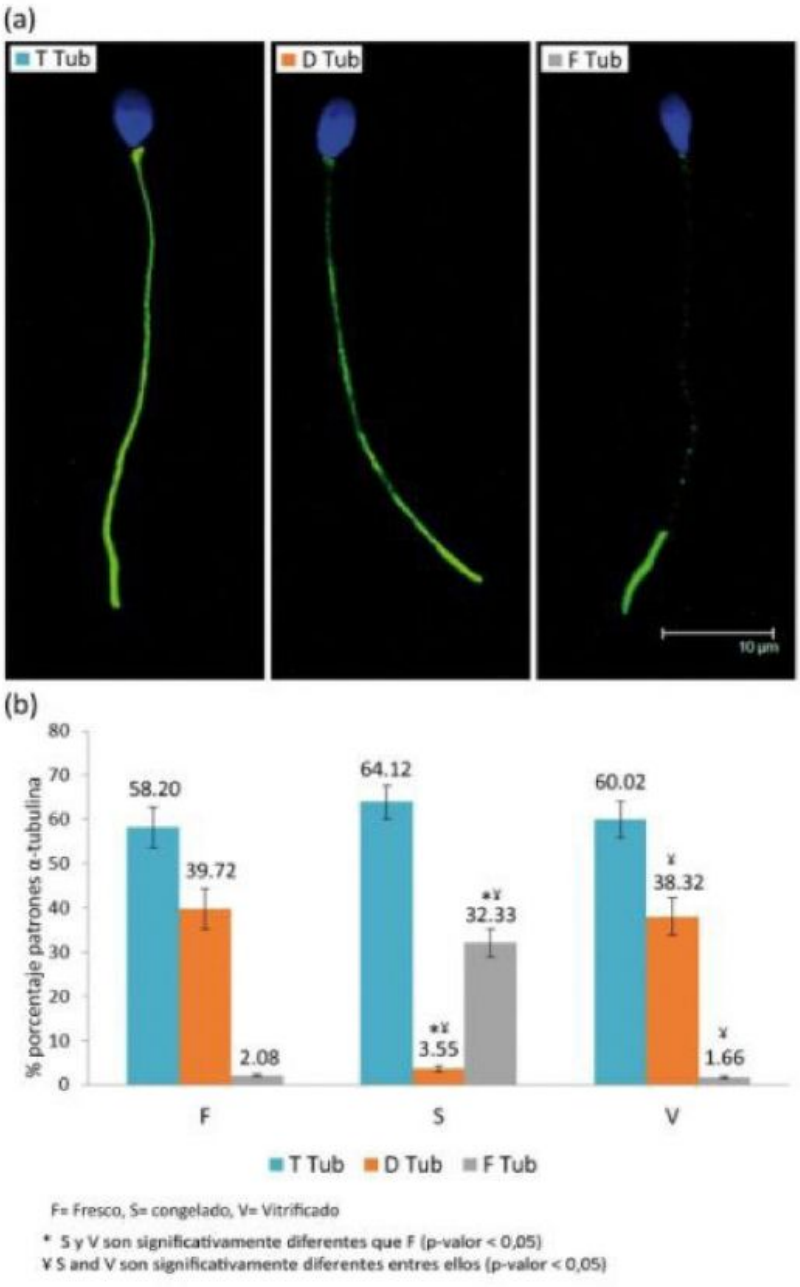


Figura 3: Patrones de α-tubulina y su distribución en congelados y vitrificados. (a) Patrones de α-tubulina: tubulina total (T tub), tubulina discontinua (D tub) y tubulina final (F Tub). (b) Porcentajes de distribución de los patrones de tubulina en los grupos de estudio.

la longitud del flagelo (T-Tub), ii) Patrón discontinuo, el inmunomarcaje aparece de forma discontinua (D-Tub), iii) Patrón final, el inmunomarcaje está ausente en casi toda la cola excepto en el último tercio de la misma (F-Tub) (Figura 3a). Estos tres patrones presentaban una distribución similar entre los grupos F y V (Figura 3b), hecho que no se daba en el grupo S donde las frecuencias de D-Tub y F-Tub eran significativamente diferentes a los encontrados en los otros dos grupos de estudio (ANOVA, $p<0,05$).

Los resultados obtenidos tras la F2 del estudio, en la que se evalúan ambos métodos de criopreservación dentro del mismo ciclo, se observó que, si bien no había diferencias significativas en ninguno de los dos grupos de estudio debido al bajo número de casos evaluado, parece observarse una tendencia a la mejora en todas las tasas estudiadas del grupo de vitrificación, excepto fecundación, llegando a alcanzarse una diferencia media entre un 20% y un 30% (Tasa de blastocisto útil, de buena calidad, tasa de blastocisto H) (Tabla II).

DISCUSIÓN

Los resultados presentados en el siguiente estudio muestran que el nuevo protocolo de vitrificación preserva la calidad de los espermatozoides y rinde mejores resultados a nivel celular. Además, parece observarse una tendencia a obtener mejores resultados en los ciclos de ovodonación fecundados mediante muestras vitrificadas que con muestras congeladas.

En cuanto a la motilidad, los resultados obtenidos en V resultaron mayores tasas de espermatozoides motiles en comparación S. Diferentes publicaciones han descrito una correlación entre la baja motilidad espermática y los daños a nivel mitocondrial (O'Connell *et al.*, 2002; Piomboni *et al.*, 2012). Debido a ello, quizá se podría interpretar que la estructura y función mitocondrial se encontrarían mejor preservadas mediante el proceso de vitrificación.

El estudio de la morfología espermática mostró mejores resultados tras la

vitrificación en comparación con la congelación lenta. Ozkavuku *et al.* (2008) mostró que la formación de cristales de hielo extracelulares eran el principal factor físico que afectaba a la morfología y que los cambios osmóticos rápidos que sufre la célula durante la congelación-descongelación debido a la adición y retirada de crioprotectores con la correspondiente entrada y salida de agua, también podían ser responsables de las anormalidades observadas en la cola. Estos resultados son acordes con nuestros resultados, revelando el gran número de colas enrolladas que observamos en el grupo S frente a V, entorno al 20% de diferencia. Esto posiblemente se deba al no uso de crioprotector permeable en V y a la no formación de cristales de hielo que permiten disminuir los efectos negativos de los cambios osmóticos (Isachenko *et al.*, 2004; Morris, 2006).

En la evaluación de la vitalidad espermática, se observó un descenso significativo tras ambos protocolos, siendo significativamente mayor en el grupo S. La reducción de la vitalidad espermática puede deberse a las causas expuestas anteriormente, adición de crioprotectores y formación de cristales (Morris, 2006; Chaytor *et al.*, 2012). Aunque también se ha descrito que las variaciones de temperatura pueden dar lugar a roturas o micro-roturas que producen un daño subletal que conlleva a la muerte celular (Alvarez and Storey, 1993; Ozkavukcu *et al.*, 2008). Los eventos implicados en la reducción de la vitalidad espermática también podrían explicar el aumento en el porcentaje de espermatozoides reaccionados espontáneamente que se encuentran tras la congelación lenta y la vitrificación. Además, el descenso de temperatura asociado con la congelación lenta puede causar aumento en los niveles de calcio citoplasmático e inducir los cambios relacionados con la capacitación y la exocitosis del contenido acrosomal (Silva and Gadella, 2006). Por el contrario, el grupo V presenta un descenso de temperatura mucho mayor y por lo tanto, podría protegerlo y no inducir el proceso de exocitosis acrosomal.

La presencia de roturas en el ADN espermático puede conllevar efectos negativos, no solo a nivel de desarrollo embrionario, sino también tras el nacimiento, durante la niñez y en la vida adulta (Lewis *et al.*, 2013). La disminución significativa en el daño del ADN observada en V frente a S, puede deberse al no uso de glicerol en la vitrificación, que se ha relacionado con la activación de caspasas y a la posterior fragmentación del ADN (Wündrich *et al.*, 2006). Además el estrés oxidativo también se ha reportado como uno de los causantes de la fragmentación (Zribi *et al.*, 2010), hecho que explicaría el aumento en V y S de la fragmentación del ADN frente a F.

Los daños observados indirectamente mediante el estudio de la reacción acrosómica espontánea, la vitalidad y la fragmentación del ADN se ven representados en las microfotografías obtenidas mediante MET. Los defectos descritos en las microfotografía de los espermatozoides tras el proceso de congelación/descongelación, coinciden con los expuestos previamente por Ozkavukcu *et al* (2008). Sin embargo es la primera vez que se describen los daños ultraestructurales mediante MET en espermatozoides humanos tras su vitrificación.

La evaluación del citoesqueleto muestra patrones similares de distribución entre F y V que confirman el bajo impacto que tiene la vitrificación en esta molécula, hecho que no ocurre con el grupo S. Estudios previos han reportado alteraciones en la detección de tubulina tras la congelación espermática (Desrosiers *et al.*, 2006; Gómez-Torres *et al.*, 2017), reportando tres posibles explicaciones a la diferencia en los porcentajes de patrones que presenta S frente a F y V: i) debilidad en la estructura de la cola debido al proceso de congelación-descongelación; ii) susceptibilidad de la α-tubulina a los cambios postranslacionales que afectan a los sitios de unión de los anticuerpos de la tubulina y por lo tanto su unión y su señal; iii) la desunión de moléculas producidas como resultado de la entrada de calcio durante la congelación.

Por lo tanto, este estudio muestra que el protocolo de vitrificación propuesto en este trabajo, permite obtener mejores resultados a todos los niveles evaluados en la F1 (motilidad, vitalidad, estructura del DNA, acrosoma, morfología y citoesqueleto) comparado con la congelación lenta, y constituyendo una alternativa más eficaz y segura de la criopreservación espermática. Además los primeros resultados en pacientes son prometedores, a pesar de que las diferencias no son significativas por el bajo número de casos. Por lo tanto es necesario ampliar la segunda fase del estudio además de evaluar en muestras patológicas el efecto que tiene el protocolo de vitrificación.

AGRADECIMIENTOS

A los pacientes que han colaborado con la realización de este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

Alvarez JG, Storey BT. Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: glycerol and other polyols as sole cryoprotectant. J Andrology 1993;14:199–209.

Balaban B, Brison D, Calderon G, Catt J, Conaghan J, Cowan L, Ebner T, Gardner D, Hardarson T, Lundin K, *et al.* The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. Human Reproduction [Internet] 2011;26:1270–1283

Chaytor JL, Tokarew JM, Wu LK, Leclre M, Tam RY, Capicciotti CJ, Guolla L, Moos E Von, Findlay CS, Allan DS, *et al.* Inhibiting ice recrystallization and optimization of cell viability after cryopreservation. Glycobiology 2012;22:123–133.

Desrosiers P, Legare C, Leclerc P, Sullivan R. Membranous and structural damage that occur during cryopreservation of human sperm may be time-related events. Fertil Steril 2006;85:1744–1752.

Fabbri R, Ciotti PM, Tommaso B Di, Magrini O, Notarangelo L, Porcu E, Contro E, Venturoli S, Ostetrica C, Umana R. Tecniche Di Crioconservazione Riproduttiva. Riv It Ost Gin 2004;3:33–40.

Fouquet JP, Prigent Y, Kann ML. Comparative immunogold analysis of tubulin isoforms in the mouse sperm flagellum: unique distribution of glutamylated tubulin. Mol Reprod Dev 1996;43:358–365.

Gómez-Torres MJ, Mira P, Fuentes MC, Aviles M, Romero A. Ultraestructure of human sperm cephalic vacuoles. Andrology 2014;2: 72

Gómez-Torres MJ, Medrano L, Romero A, Fernández-Colom PJ, Aizpurua J. Effectiveness of human spermatozoa biomarkers as indicators of structural damage during cryopreservation. Cryobiology 2017;In Press:

Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, Rahimi G, Schöndorf T, Mallmann P, Dessole S, Nawroth F. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. Hum Reprod 2004;19:932–939.

Isachenko E, Isachenko V, Weiss JM, Kreienberg R, Katkov II, Schulz M, Lulat a. GMI, Risopatrón MJ, Sánchez R. Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose. Reprod Res2008;136:167–173.

Isachenko V, Isachenko E, Petrunkina AM, Sánchez R. Human spermatozoa vitrified in the absence of permeable cryoprotectants: Birth of two healthy babies. Reprod Fertil Dev 2012a;24:323–326.

Isachenko V, Maettner R, Petrunkina AM, Sterzik K, Mallmann P, Rahimi G, Sánchez R, Risopatron J, Damjanoski I, Isachenko E. Vitrification of human ICSI/IVF spermatozoa without cryoprotectants: new capillary technology. J Androl 2012b;33:462–468.

Katkov II, Isachenko V, Isachenko E, Kim MS, Lulat AG-MI, Mackay AM, Levine F. Low- and high-temperature vitrification as a new approach to biostabilization of reproductive and progenitor cells. Int J Refrig 2006;29:346–357.

Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Veeck LL, Morshedi M, Brugo S. New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human in vitro fertilization. Urology 1987;30:248–251.

Lewis SEM, John Aitken R, Conner SJ, Iuliis G De, Evenson DP, Henkel R, Giwercman A, Gharagozloo P. The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. Reprod biomed Online 2013;27:325–337.

Lybaert P, Danguy A, Leleux F, Meuris S, Lebrun P. Improved methodology for the detection and quantification of the acrosome reaction in mouse spermatozoa. Histol Histopathol2009;24:999–1007.

Mocé E, Fajardo AJ, Graham JK. Human sperm cryopreservation. EMJ 2016;1:86–91.

Morris GJ. Rapidly cooled human sperm: no evidence of intracellular ice formation. Hum Reprod 2006;21:2075–2083.

Nawroth F, Isachenko V, Dessole S, Rahimi G, Farina M, Vargiu N, Mallmann P, Dattena M, Capobianco G, Peters D, et al. Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants. Cryo-Letters 2002;23:93–102.

O'Connell M, McClure N, Lewis SEM. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. Hum Reprod 2002;17:704–709.

Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, Oztuna D, Karahuseyinoglu S. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. J Assist Reprod Genet 2008;25:403–411.

Piomboni P, Focarelli R, Stendardi A, Ferramosca A, Zara V. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. Int J Androl 2012;35:109–124.

Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R, Labarbera AR, Kaser DJ, Ubaldi FM, Vanderpoel S, Racowsky C. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. Hum Reprod Update 2016;23:1–17.

Sánchez R, Schulz M, Risopatrón J, Isachenko V, Isachenko E. Vitrificacion de espermatozoides: Una alternativa a la inyeccion intracitoplasmatica de espermatozoides en paciente con oligoastenozoospermia severa. Rev Int Androl 2013;11:36–39.

Silva PFN, Gadella BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. Theriogenology 2006;65:, p. 958–978.

Slabbert M, Plessis SS du, Huyser C. Large volume cryoprotectant-free vitrification: An alternative to conventional cryopreservation for human spermatozoa. Andrologia 2015;47:594–599.

VerMilyea MD, Tan L, Anthony JT, Conaghan J, Ivani K, Gvakharia M, Boostanfar R, Baker VL, Suraj V, Chen AA, *et al*. Computer-automated time-lapse analysis results correlate with embryo implantation and clinical pregnancy: a blinded, multi-centre study. Reprod Biomed Online 2014;29:729–736.

WHO. Examination and processing of human semen. Fifth Edition. Geneva: WHO Press; 2010

Wündrich K, Paasch U, Leicht M, Glander H-J. Activation of caspases in human spermatozoa during cryopreservation--an immunoblot study. Cell Tissue Bank 2006;7:81–90.

Zou Y, Yin T, Chen S, Yang J, Huang W. On-Chip Cryopreservation: A Novel Method for Ultra-Rapid Cryoprotectant-Free Cryopreservation of Small Amounts of Human Spermatozoa. PLoS ONE 2013;8:e61593.

Zribi N, Feki Chakroun N, Euch H El, Gargouri J, Bahloul A, Ammar Keskes L. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. FertilSteril 2010;93:159–166.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA, COMBINANDO DETECCIÓN DE ANEUPLOIDÍAS Y TRASTORNOS MONOGÉNICOS

Luis A. Alcaraz, Vanessa Penacho, Santiago González-Reig, Natalia Castejón-Fernández, Francisco Galán, Diego Amorós, Helena Blanca, Leonardo Díaz, Miguel Fernández.
Bioarray, S.L. Parque Científico de la UMH. Avda Universidad s/n. 03202 Elche (Alicante).
Email: luis.alcaraz@bioarray.es - Tel: 966682500

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) se desarrolló en la década de los 80 como una opción para aquellas parejas que estaban en riesgo de tener un hijo afectado por una enfermedad monogénica o una alteración cromosómica determinada, y que querían evitar la posibilidad de requerir una terminación voluntaria del embarazo (Handyside *et al.*, 1989). El DGP hace referencia a la determinación del perfil genético de los embriones ligados a técnicas de reproducción asistida previo a la transferencia. Básicamente, consiste en biopsiar una o más células de los embriones generados durante un ciclo de fecundación in vitro, y utilizar dicho material para elaborar un diagnóstico genético. Así, sólo aquellos embriones diagnosticados como no afectados por una determinada alteración genética son transferidos para poder engendrar un niño no afectado.

Normalmente, el DGP se realiza utilizando múltiples y variadas técnicas, dependiendo de la naturaleza de la alteración estudiada. Tradicionalmente, para las enfermedades monogénicas se utilizan métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Verlinsky *et al.*, 1998) y, más recientemente, sistemas como Karyomapping, basado en la utilización de microarrays aplicados a la detección de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) (Handyside *et al.*, 2010). Para el diagnóstico de anomalías cromosómicas, en cambio, se utilizó originariamente FISH, una técnica prácticamente en desuso, y, posteriormente, aplicando sistemas de microarray de hibridación genómica comparativa (aCGH) (Gutiérrez-Mateo *et al.*, 2011).

Después de más de 30 años de aplicación efectiva, el DGP se considera como una técnica bien establecida, con más de seis mil niños sanos nacidos en todo el mundo. La presencia de aneuploidias en embriones humanos supone la mayor causa de fallos de implantación y abortos (Fragouli *et al.*, 2013). Sólo los embriones con un número correcto de cromosomas se implantarán con éxito y darán lugar al nacimiento de un niño considerado sano. En esta línea, el diagnóstico genético preimplantacional de aneuploidías (DGP-A) se ha desarrollado como una herramienta útil para detectar anomalías cromosómicas numéricas en embriones antes de su transferencia (Wells *et al.*, 2008). El DGP-A ha demostrado aumentar las tasas de embarazo, reducir el tiempo para lograrlo, así como minimizar las posibilidades de aborto. Es más, el DGP-A ha resultado de utilidad no sólo en parejas con mal pronóstico, sino también en aquellas consideradas con un buen pronóstico (Scott *et al.*, 2013).

Finalmente, son varios los estudios que han mostrado la aplicación combinada de DGP para enfermedades monogénicas y DGP-A para el cribado de aneuploidías. Para ello, algunos autores han utilizado una combinación de aCGH o microarrays de SNPs para la detección de aneuploidías, junto con el análisis de mutaciones puntuales mediante secuenciación capilar y/o el estudio de marcadores de ligamiento, en ocasiones requiriendo incluso la realización de varias biopsias (Natesan *et al.*, 2014; Rechitsky *et al.*, 2013). En cualquier caso, la combinación de estas técnicas requería un largo proceso de puesta punto, individualizado para cada pareja, además de incrementar sustancialmente el coste del proceso debido a la utilización de diferentes metodologías y equipamientos. Por tanto, eran pocos los laboratorios que podían disponer del material necesario para realizar DGP y DGP-A de manera combinada.

Recientemente, ha aparecido una tecnología alternativa para el análisis simultáneo de aneuploidías y enfermedades monogénicas, conocida como Karyomapping. Esta es una aproximación considerada universal para el uso en PGD, basada en el análisis de ligamiento para detectar patologías monogénicas además de determinadas alteraciones citogenéticas con un único ensayo. Sin embargo, esta tecnología presenta algunas limitaciones. En primer lugar, la técnica no detecta *per se* variaciones de número de copia de origen postcigótico, viéndose por tanto comprometida la capacidad de detección de mosaicismos (Natesan *et al.*, 2014). Además, la detección de mutaciones patogénicas se basa exclusivamente en la aplicación de un método indirecto mediante estudio de ligamento, por tanto, no contempla la detección directa de las mutaciones de interés. Así, se hace necesario que exista en todo momento algún familiar de primer grado portador de la mutación, además de la pareja, para poder determinar la segregación de los polimorfismos y así poder conocer si los embriones han heredado o no los alelos mutados. Sin embargo, cada vez es más frecuente que no esté disponible dicho familiar afecto por diversas causas. En estos casos, es donde Karyomapping no puede ser aplicado y la mutación requiere ser analizada en los embriones mediante métodos convencionales.

Por otro lado, con la llegada de la secuenciación masiva, son numerosos los estudios realizados con el objetivo de determinar su utilidad para la

realización de DGP (Fiorentino *et al.*, 2014). La secuenciación masiva (NGS, por sus siglas en inglés) permite secuenciar grandes cantidades de ADN de una forma más rápida y eficaz que su predecesora, la secuenciación capilar. Esta tecnología ha demostrado ser eficiente y escalable, pero, sobretodo, más precisa para la determinación de variaciones de número de copia (aneuplodías y alteraciones segmentarias) en DGP que otras tecnologías, como el microarray CGH, el array de SNPs, o la PCR cuantitativa, entre otras. Además, también ha sido eficiente en la detección de mutaciones genéticas en célula única. Un artículo publicado por Wells y colaboradores (Wells *et al.*, 2014) discute la potencial aplicación de la NGS para la detección simultánea de anomalías cromosómicas y mutaciones puntuales en embriones, realizando una prueba de concepto con el análisis de una mutación en el gen *CFTR*. Sin embargo, en ninguno de estos artículos se realizó un análisis de ligamiento adicional para determinar la precisión del test, por lo que su aplicabilidad real estaba comprometida.

De manera general en el estudio de DGP para una enfermedad monogénica, se recomienda realizar dos tipos de análisis simultáneos. El primero de ellos, el análisis directo, consiste en la detección de la mutación en sí. Esto se suele realizar mediante secuenciación capilar o minisecuenciación. Un resultado positivo (es decir, la detección de la mutación) supone la clasificación del embrión como portador de dicha alteración. Sin embargo, un resultado negativo no suele ser concluyente debido a que no se puede excluir un efecto de *allele drop-out* (causado por la amplificación de manera preferencial de uno de los alelos), lo que supondría clasificar como sano un embrión que realmente no lo es. Por este motivo, siempre se recomienda un segundo análisis, el análisis indirecto, que consiste en la determinación de polimorfismos que estarán asociados al alelo patológico o al sano, según el caso. La realización de este análisis se suele hacer mediante el escrutinio de repeticiones cortas en tándem (STR) alrededor de la mutación de interés, a través de un análisis de fragmentos. Además, como ya se ha mencionado, el estudio de STRs y su cosegregación se debe realizar con antelación al ciclo y requiere del análisis de la pareja y generalmente de otro miembro afecto (es lo que se conoce como estudio de informatividad).

Aunque esta combinación de análisis directo e indirecto está bien establecida en DGP mediante técnicas convencionales, no ha sido llevada a la práctica con NGS. Uno de los motivos se debe a que, generalmente, no es posible analizar de manera fiable STRs mediante NGS por limitaciones técnicas. Es por ello que se debería optar por el análisis de SNPs en su lugar. Sin embargo, en las zonas circundantes a la mutación de interés puede haber varios miles de SNPs, y no es fácil escoger aquellos que pueden dar información útil. Además, el análisis necesario para determinar el haplotipo de los embriones es bastante laborioso, puesto que generalmente requiere estudiar numerosos SNPs al detalle. Por todo esto, hasta la fecha, no existe ningún método sistematizado, completo y robusto que permita el DGP para una enfermedad monogénica mediante secuenciación masiva.

Concluyendo, como ya se ha comentado, la combinación de DGP y DGP-A mediante NGS resulta de especial interés, principalmente porque permitiría una simplificación del flujo de trabajo y un abaratamiento de los costes asociados. Sin embargo, existen limitaciones técnicas que lo dificultan, como por ejemplo la cobertura (el número de veces que se secuencia una misma región) o la longitud de las lecturas. Así, por ejemplo, para DGP-A se requiere un análisis de baja cobertura (por debajo de 0,01X), mientras que para DGP para enfermedades monogénicas se requiere alta cobertura para tener mayor fiabilidad en los resultados (por encima de 100X). Además, sistemas como VeriSeq™ de Illumina utiliza lecturas cortas (36 bp) para DGP-A, mientras que para DGP se requeriría una longitud de lectura mayor.

Por todo lo anterior, el presente trabajo pretende establecer una metodología robusta, sencilla y eficaz que permita combinar DGP-A y DGP para enfermedades monogénicas utilizando en todo el proceso exclusivamente técnicas de secuenciación masiva. El protocolo desarrollado permitirá realizar estudio directo e indirecto basado en SNPs, escogiendo aquellos con mayor probabilidad de ser informativos en una región muy cercana a la mutación de interés. En este estudio también se aborda el desarrollo de un algoritmo para la realización del análisis de los resultados. Todo ello, integrado en un flujo de trabajo lo suficientemente rápido como para permitir obtener resultados en menos de 12 horas, habilitando así la posibilidad de transferencia en fresco.

MATERIALES Y MÉTODOS

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

La validación del protocolo de DGP-A se realizó en dos fases. En la primera de ellas, se analizaron diversas líneas celulares con distintas aneuploidías. En segundo lugar, se analizaron muestras procedentes de biopsias en D+3 o D+5 de pacientes que habían sido previamente remitidos para su estudio mediante microarrays. En total, se analizaron más de 200 muestras.

También se estudiaron 242 embriones provenientes de 47 parejas con traslocaciones balanceadas (30 recíprocas y 17 robertsonianas). El cariotipo de las parejas analizadas se refleja en la Tabla I.

Para el estudio de DGP de enfermedades monogénicas, se han estudiado 40 parejas portadoras de distintas patologías genéticas (Tabla II).

DETECCIÓN DE ANEUPLOIDÍAS

Para la detección de aneuploidías, se utilizó el kit Ion Reproseq (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA). Básicamente, las biopsias se obtuvieron en 5 µl de PBS. El ADN se extrajo y amplificó siguiendo las recomendaciones del fabricante. El protocolo de amplificación consiste en un método basado en PCR, que consta de tres partes: lisis y fragmentación, preamplificación y amplificación. Durante la última fase de amplificación se añaden los códigos de barras moleculares que servirán para la

46,XX,t(1;2) (q32;p25)
46,XY,t(1;5) (p12;p15.3)
46,XY,t(1;5) (q44;q12)
46,XX,t(2;3) (p25.1;p13)
46,XX,t(2;7) (p25.1;p15.1)
46,XY,t(2;11) (q21.1;p15.5)
46,XY,t(3;4) (p23;q33)
46,XY,t(3;4) (q26.3;q34)
46,XX,t(3;7) (q27.3;M p21.3)
46,XX,t(3;9) (p21.1;q34.1)
46,XX,t(3;11) (q25;q24)
46,XY,t(8;10) (q24;q24)
46,XY,t(12;179 (q24.3;q25)
46,XX,t(1;4) (q24;q31)
46,XY,t(1;5) (p13;p13)
46,XY,t(2;18) (q23;q12.1)
46,XY,t(3;17) (p23;q23.1)
46,XY,t(4;9) (p15.3;q31.2)
46,XY,t(4;11) (q28;q22)
46,XX,t(2;13) (p25.1;q22)
46,XY,t(4;14) (p16;q31)
46,XX,t(9;22) (q34;q13.31)
46,XY,t(6;22) (q22.2;q21.1)
46,XY,t(11;22) (q23;q11)
46,XX,t(13;15) (q22.1;p11.2)
45,XY,rob(13;14) (q10;q10)
45,XX,rob(13;14) (q10;q10)
45,XY,rob(13;15) (q10;q10)
45,XX,rob(14;21) (q10;q10)
45,XY,rob(14;21) (q10;q10)

Tabla I: Cariotipo de las parejas analizadas

identificación posterior de las muestras durante el análisis. De esta manera, la amplificación y preparación de librerías se realiza simultáneamente. En todos los casos se mantuvieron dos controles negativos (el diluyente utilizado en el proceso y el mismo PBS utilizado para la biopsia) y un control positivo consistente en ADN genómico disponible comercialmente (Promega; Madison, WI, USA) a una concentración aproximada de 6,25 pg/ul.

Tras la amplificación, se midió la concentración del ADN obtenido mediante byQu-bit® High Sensitivity dsDNA (Thermo Fisher Scientific). Las muestras fueron multiplexadas y llevadas a una concentración de 100 pM antes de la amplificación clonal mediante el kit Isothermal Amplification/Ion One Touch (Thermo Fisher Scientific). Finalmente, la secuenciación se realizó en la plataforma Ion PGM (Thermo Fisher Scientific) con una química de 100bp.

El análisis de datos primario se llevó a cabo mediante Ion Torrent Suite, y para la identificación de alteraciones se utilizó el software Ion Reporter (Thermo Fisher), el cual aplica el algoritmo Hidden Markov Model (HMM) para la identificación de aneuploidías y/o alteraciones segmentales.

LECTURAS MÍNIMAS NECESARIAS PARA LA DETECCIÓN DE ANEUPLOIDÍAS

Con el fin de determinar el número mínimo de lecturas necesarias para la detección de alteraciones cromosómicas de manera fiable, se seleccionaron nueve de los embriones analizados. Estos embriones contenían tanto alteraciones segmentarias (consecuencia de traslocaciones balanceadas) como aneuploidías

Gen	Patología
ACADM	Deficiencia Acetil CoA
BSS1	Síndrome de Bardet-Bield
CFTR	Fibrosis quísitca
COL11A1	Síndrome de Stickler 2
COL1A1	Osteogénesisimperfecta
COL2A1	Síndrome de Stickler tipo 1
CYP21A1	Hiperplasia adrenal congénita
D4Z4	Distrofia fascioescapulohumeral
DMD	Distrofia muscular de Duchenne
DPMK	Síndrome de Steinert
EVC	Síndrome de Ellis-van Creveld
EXT1	Exostosis multiple 1
EXT2	Exostosis multiple tipo 2
F8	Hemofilia A
FBN1	Síndrome de Marfan
FMR1	Síndrome de X-frágil
FUS	Esclerosis Lateral Amiotrófica
GALNS	Morquio
GJA1	DisplasiaOculodentodigital
HBB	Beta talasemia
HEXA	Síndrome de Tay-Sachs
HTT	Enfermedad de Huntington
IL2RG	Inmunodeficienciacombinada grave
L1CAM	Síndrome L1
LAMB3	Epidermolisisbullosa
MEN1	Neoplasiaendocrinamúlitipletipo 1
MPZ	Charcot-Marie-Tooth
NOTCH3	CADASIL
PKD1	Enfermedad poliquística renal, autosómica dominante
PKHD1	Enfermedad poliquística renal, autosómica recesiva
RET	Neoplasiaendocrina multiple
RHO	Retinitis pigmentosa
SMN1	Distrofia muscular espinal
SPG3A	Paraplejía Espástica Hereditaria
TBX5	Síndrome de HoltOram
TCOF1	Síndrome de Treacher-Collins
TSC	Esclerosistuberosa
TWIST1	Síndrome de Saethre-Chotzen
UNC13D	Linfohistiocitosishemofagocítica familiar

Tabla II: Genes y patologías estudiadas mediante NGS incluyendo DGP-A, análisis directo de la mutación y análisis indirecto mediante polimorfismos.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

concretas en diferentes cromosomas. Previamente, se normalizó cada embrión a un total de 100.000 lecturas y con esas lecturas se generó un fichero primario en formato BAM (Binary Alignment/Map format). Posteriormente, se fueron reduciendo sucesivamente el número de lecturas en estos archivos BAM, de manera aleatoria y hasta un mínimo de 100 lecturas mediante la herramienta bioinformática SAM tools. El proceso se realizó por triplicado para evitar sesgos. Los nuevos ficheros BAM así generados se dispusieron en la plataforma Ion Reporter para su análisis.

En paralelo, se calculó el parámetro MAPD para cada fichero. El MAPD es un parámetro obtenido durante el análisis cromosómico similar a la desviación estándar. Un análisis con un valor de MAPD por encima de 0,3 se considera demasiado ruidoso como para ser analizado. De esta manera, se estableció una correlación entre el número de lecturas y el valor de MAPD.

DETECCIÓN DE MOSAICISMOS

Con el fin de determinar si esta técnica de NGS es lo suficientemente sensible como para detectar niveles de mosaicismo especialmente bajos, en biopsias en embriones en día 5, se realizó una nueva simulación bioinformática. En esta ocasión, se combinaron lecturas de embriones euploides y aneuploides en diversas proporciones, generando así archivos BAM que emulaban los obtenidos de embriones que podían variar entre el 10% y el 90% de mosaicismo. El proceso se realizó por triplicado, resultando un total de 540 ficheros BAM que fueron analizados con el software del Ion Reporter.

ANÁLISIS DE ANEUPLOIDÍAS MEDIANTE MICROARRAY CGH

Como se ha mencionado anteriormente, las muestras analizadas en la primera parte de la validación habían sido analizadas previamente mediante microarray CGH. Este análisis se realizó con la plataforma 24sure v3 (Illumina) siguiendo las instrucciones del fabricante. La lectura de los arrays se realizó con un escáner Agilent (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Las imágenes se procesaron con Blue Fuse Multi (Illumina).

DGP DE ENFERMEDADES MONOGÉNICAS MEDIANTE NGS

Para la detección de enfermedades monogénicas se siguió la doble aproximación recomendada, es decir, el estudio directo para la detección de la mutación (siempre que fuera posible) y el estudio indirecto para minimizar el riesgo de ADO. Para amplificar estas regiones, se diseñaron paneles de PCR multiplex AmpliSeq (Thermo Fisher Scientific) para cada una de las parejas. La tecnología de AmpliSeq permite amplificar en una única PCR cientos e incluso miles de productos de PCR, reduciendo drásticamente el tiempo de preparación de muestra.

El primer paso consiste en el diseño del panel en sí. Para ello, se seleccionaron entre 150 y 200 polimorfismos en una región cercana a la mutación de interés (dispuestos aproximadamente en una región inferior a 1 Mb a ambos lados del gen) de forma que las probabilidades de recombinación fueran inferiores al 0,1%. Para seleccionar aquellos polimorfismos con mayor probabilidad de ser informativos, se ha desarrollado un software adicional el cual analiza la frecuencia de estos polimorfimos en diversas bases de datos poblacionales (1000 genomes, ExAC, etc), teniendo en cuenta diversos factores como la frecuencia alélica o la existencia de equilibrio de ligamiento.

Una vez diseñado el panel, se procede a la amplificación simultánea de dichas regiones. Para ello, se tomaban 5 ul de ADN amplificado con ReproSeq y se procesa con el panel de AmpliSeq. Finalmente, ambas librerías (AmpliSeq y ReproSeq) se combinaban para proseguir con las fases de amplificación clonal y secuenciación. A todas las muestras se le añadía un código de barras molecular distinto para poder procesar dichas muestras juntas en la misma reacción de secuenciación.

Para el análisis primario de resultados, se utilizó en primer lugar Ion Torrent Suite. Con este software, se obtiene un listado de todas las posiciones amplificadas con el panel de AmpliSeq y los nucleótidos detectados en esa posición.

Para el análisis secundario, se desarrolló una herramienta bioinformática basada en Python con el objetivo de realizar el proceso de fasado de SNPs, que consiste en poder determinar qué polimorfismos segregan con cada uno de los alelos de los padres. En este último paso, se realiza el análisis de los polimorfismos detectados en la pareja y se comparan con los de otro individuo afecto (generalmente un hijo previo) o con alguno de los embriones en los cuales se había detectado la mutación. De esta forma, se obtiene el haplotipo de la pareja, que es posteriormente comparado con el resto de embriones.

DGP DE ENFERMEDADES MONOGÉNICAS CONVENCIONAL

Para la validación de los resultados de secuenciación masiva, se utilizaron técnicas convencionales. Para el estudio directo, se diseñaron oligos que amplificaran dicha región y se analizaron las mutaciones mediante secuenciación capilar o mediante minisecuenciación. Además, se llevó a cabo el análisis de diversos STRs utilizando técnicas de análisis de fragmentos. Todas las muestras se analizaron en un secuenciador capilar ABI3130 (Thermo Fisher Scientific).

RESULTADOS

El análisis de aneuplodías mediante secuenciación masiva utilizando Ion Reproseq (Thermo Fisher Scientifc) obtuvo una concordancia prácticamente completa comparada con los resultados previos obtenidos mediante microarray CGH en más de 200 muestras. Además, la correspondencia de embriones eupolides/aneuploides fue total en ambas técnicas. Sin embargo, en aquellos embriones con múltiples alteraciones existieron ciertas divergencias en los cromosomas considerados alterados. El análisis manual de estas discordancias muestra una sensibilidad mayor de la tecnología de secuenciación masiva frente al microarray CGH. Puesto que el kit de amplificación es muy similar en ambas

técnicas, la tasa de fallo de amplificación se ha mantenido invariable entre ambos protocolos (alrededor de un 5% para las biopsias en día 3 e inferior al 1% para biopsias en día 5). No se han detectado falsos positivos ni falsos negativos, así como tampoco errores en la determinación del sexo.

El análisis de los embriones procedentes de parejas con alteraciones equilibradas ha arrojado diversos resultados. En primer lugar, en los embriones analizados procedentes de traslocaciones recíprocas se observaron diferencias entre los distintos grupos: en el grupo 1 (translocaciones con puntos de rotura distales) las segregaciones alternantes son menos frecuentes (35.9%) que las segregaciones no equilibradas (segregaciones adyacentes I y II, 3:1, 4:0) (64.1%), mientras que en el grupo 2 (con traslocaciones sin puntos de rotura terminales) son más frecuentes las segregaciones alternantes (57.7%) que las no equilibradas (42.3%). Para las translocaciones robertsonianas, las segregaciones alternantes son mucho más frecuentes (76%) que las no equilibradas (24%). En los tres grupos es muy frecuente la aparición de anomalías numéricas y/o estructurales no relacionadas con los cromosomas implicados en la translocación, en aproximadamente el 50% de los casos; esto es especialmente importante puesto que afecta al porcentaje de embriones potencialmente transferibles. Puesto que los embriones transferibles son aquellos que derivan de segregaciones alternantes, si eliminamos aquellos embriones con anomalías numéricas y/o estructurales adicionales, los embriones transferibles suponen el 17.6% del total de embriones procedentes de translocaciones recíprocas y el 38% de los procedentes de translocaciones robertsonianas; así, independientemente del tipo de translocación, aproximadamente el 50% de los embriones procedentes de segregaciones alternantes serían transferibles. Finalmente, el estudio de estos embriones también nos ha permitido establecer el límite de detección en cuanto al tamaño de la alteración. El software Ion Reporter es capaz de detectar alteraciones a partir de 10Mb, si bien mediante inspección manual se pueden identificar alteraciones de hasta unas 5Mb. Sin embargo, existen diferencias en cuanto a la capacidad de detección dependiendo del cromosoma y de la región afectada.

El número mínimo de lecturas obtenidas en la secuenciación que permite detectar dichas alteraciones se ha establecido en unas 30.000 lecturas. Por debajo de ese valor, la dispersión de las lecturas y, por tanto, el MAPD empiezan a ser significativos, por lo que los resultados dejan de ser confiables. Con estos datos, a nivel interno hemos establecido un valor mínimo de 50.000 lecturas como punto de corte para dar un análisis por válido.

El análisis del nivel de mosaicismo dio unos resultados por debajo de lo esperado. En general, el límite de detección por Ion Reporter se situó en torno al 60%, si bien encontramos variaciones en cuanto al cromosoma afectado. Este nivel es demasiado alto, dado que según las últimas recomendaciones del PGDIS se deben reportar mosaicismos por encima del 20%. Mediante inspección manual se podía identificar mosaicismo a un nivel inferior, pero este tipo de análisis introduce cierta subjetividad. Para solventar eso, se desarrolló un algoritmo propio capaz de identificar mosaicismos denominados de "bajo nivel". Este algoritmo está basado en el estadístico z-score. Con él, hemos sido capaces de detectar niveles por debajo del 20% tanto para aneuplodías como para alteraciones segmentales.

Finalmente, se ha podido establecer una estrategia para el DGP de enfermedades monogénicas mediante secuenciación masiva. Esta estrategia incluye el análisis directo y el indirecto mediante secuenciación de SNPs. En el protocolo presentado se incluye la aplicación de un algoritmo para la selección de aquellos polimorfismos con mayor probabilidad de ser informativos (cabe destacar que esta selección de SNPs se hace sin tener información previa de la pareja), un protocolo de laboratorio que permite su integración con el análisis de DGP-A, y un software para el análisis de los haplotipos de los pacientes, para el estudio de informatividad. Con esta técnica se han estudiado más de 40 parejas con múltiples alteraciones genéticas, entre ellas, fibrosis quística, beta talasemia, o la atrofia muscular espinal. Se ha podido aplicar incluso a un genotipado HLA, y al análisis simultáneo de hasta dos alteraciones diferentes. La tasa de *alleledrop-out* con esta técnica es similar a la mostrada mediante técnicas convencionales, es decir, alrededor de un 10%. Cuando se ha realizado la comprobación del resultado obtenido mediante técnicas convencionales (análisis de STRs, principalmente), la concordancia ha sido completa.

DISCUSIÓN

Mediante el presente trabajo demostramos, por primera vez, que aplicando la tecnología NGS mediante la plataforma Ion PGM (ThermoiFisher) es posible realizar simultáneamente y en la misma biopsia embrionaria un estudio de aneuploidías (DGP-A) tanto numérico como estructural de todos los cromosomas así como la detección de enfermedades monogénicas heredadas de los padres, en menos de 24 horas, lo que posibilita la transferencia en fresco de los embriones euploides y libres de dicha enfermedad.

La utilidad del PGD-A viene siendo cada vez más evidente, entre otras, debido al alto riesgo de cromosomopatías que se pueden presentar en embriones humanos debido a múltiples factores. Entre ellos, el más llamativo y frecuente en la población de pacientes que realizan FIV es la edad materna avanzada, la cual ha demostrado ampliamente estar directamente relacionada con errores meióticos de segregación producidos durante la ovogénesis. Gracias a la tecnología que presentamos en este estudio, es posible ofrecer un test de aneuploidías en parejas que realizan DGP por causas monogénicas, lo que aumentaría sustancialmente sus posibilidades de gestación a término y libre de la enfermedad genética realizando ambos estudios en la misma muestra, con una alta especificidad y sensibilidad según los

estudios de validación mostrados en el presente estudio.

Además, el protocolo es lo suficientemente versátil como para permitir obtener los resultados en menos de 12 horas, habilitando la transferencia en fresco de los embriones biopsiados en día 3 o incluso en dia 5 con transfer al día siguiente.

La tecnología NGS también ha demostrado ser una técnica con mayor sensibilidad comparada con el microarray CGH. Aunque en la detección de mosaicismo embrionario se observaron unos niveles poco sensibles, el desarrollo de un algoritmo con el objetivo de detectar dicho mosaicismo resultó ser altamente sensible llegando a cuantificarse dicho mosaicismo incluso por debajo del 20%, lo que aumenta todavía más la calidad de los resultados obtenidos.

Finalmente, la combinación de DGP de monogénicas y DGP-A en un mismo protocolo supone un importante salto técnico cualitativo. La simplificación de los procesos haciéndolos más sencillamente reproducibles, y el hecho de que estén más dirigidos y consolidados supone no sólo el abaratamiento de los mismos, sino que también hace que el diagnóstico sea más robusto, reduciendo por tanto la posibilidad de error.

BIBLIOGRAFÍA

Fiorentino F, Bono S, Biricik A, Nuccitelli A, Cotroneo E, Cottone G, Kokocinski F, Michel CE, Minasi MG, Greco E. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. Hum Reprod 2014;29:2802–2813.

Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Jaroudi S, Sarasa J, Enciso M, Wells D. The origin and impact of embryonic aneuploidy. Hum Genet 2013;132:1001–1013.

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;95:953–958.

Handyside AH, Harton GL, Mariani B, Thornhill AR, Affara N, Shaw M-A, Griffin DK. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. J Med Genet 2010;47:651–8.

Handyside AH, Pattinson JK, Penketh RJ, Delhanty JD, Winston RM, Tuddenham EG. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. Lancet (London, England) 1989;1:347–9.

Natesan SA, Handyside AH, Thornhill AR, Ottolini CS, Sage K, Summers MC, Konstantinidis M, Wells D, Griffin DK. Live birth after PGD with confirmation by a comprehensive approach (karyomapping) for simultaneous detection of monogenic and chromosomal disorders. Reprod Biomed Online 2014;29:600–605.

Rechitsky S, Verlinsky O, Kuliev A. PGD for cystic fibrosis patients and couples at risk of an additional genetic disorder combined with 24-chromosome aneuploidy testing. Reprod Biomed Online 2013;26:420–30.

Scott RT, Upham KM, Forman EJ, Hong KH, Scott KL, Taylor D, Tao X, Treff NR. Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: A randomized controlled trial. Fertil Steril 2013;100:697–703.

Verlinsky O, Rechitsky S, Cieslak J, Ivakhnenko V, Strom C, Kuliev A, Verlinsky Y u. Preimplantation diagnosis of single disorders. Tsitol Genet 1998;32:14–22.

Wells D, Alfarawati S, Fragouli E. Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: Microarrays and CGH. Mol Hum Reprod 2008;14:703–710.

Wells D, Kaur K, Grifo J, Glassner M, Taylor JC, Fragouli E, Munne S. Clinical utilisation of a rapid low-pass whole genome sequencing technique for the diagnosis of aneuploidy in human embryos prior to implantation. J Med Genet 2014;51:553–562.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

LA TÉCNICA CRISPR: APLICACIONES Y LIMITACIONES

Lluís Montoliu
Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) y Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER-ISCIII), Madrid

RESUMEN

La edición genética ha revolucionado la Biología, la Biomedicina y la Biotecnología. No quedan ya prácticamente campos de la Biología en los que las herramientas de edición genética, fundamentalmente las CRISPR (acrónimo en inglés de Regiones Repetidas Cortas Interespaciadas Palindrómicas y Agrupadas), no se haya ya explorado su uso y se hayan desarrollado aplicaciones específicas, también en la biología de la reproducción. Los sistemas CRISPR se descubrieron originalmente en bacterias y arqueas, en la década de los años ochenta y principios de los noventa, momento en el que jugó un papel fundamental el microbiólogo español Francisco Juan Martínez Mojica, de la Universidad de Alicante. El propio Mojica fue quien las nombró por vez primera como CRISPR en 2002 y quien se percató, antes que nadie, de su papel como sistema de defensa adaptativo en procariotas, publicando sus resultados en 2005. Es importante conocer los más de 20 años de historia previa CRISPR, antes de que ningún investigador en biomedicina se percatara de su existencia, pues durante esos años es cuando se establecieron muchas de las propiedades que, a la postre, fueron aprovechadas cuando se convirtió este sistema inmunitario de las bacterias en un sistema de edición genética de cualquier organismo (Mojica y Montoliu, 2016). Las herramientas CRISPR en realidad no hacen nada distinto que no hicieran antes las meganucleasas, las nucleasas asociadas a dedos de Zinc (ZFN) o las TALEN (Josa *et al*. 2016). En todos los casos estas diferentes versiones de nucleasas de edición promueven un corte de doble cadena en una secuencia de ADN de forma específica, aunque usando mecanismos diversos. En todos los casos logran aumentar la eficiencia de recombinación homóloga por lo menos tres órdenes de magnitud, lo cual explica su interés y éxito en aplicarlas (Fernández *et al*. 2017). La reparación que todas las células logran establecer una vez se ha cortado el ADN en un lugar específico es lo que da lugar a las mutaciones (mediante el mecanismo de reparación denominado NHEJ) o a la edición a voluntad de la secuencia (mediante la ruta llamada HDR, tras aportar una secuencia externa como molde para la reparación, con homologías a las regiones flanqueantes y secuencias diversas internas). Las mutaciones y ediciones son posibles con cualquier nucleasa, pero los cortes se promueven de forma más eficaz y robusta con las herramientas CRISPR, de ahí su éxito. El mecanismo de acción de los sistemas CRISPR está basado en una sencilla moléculas de ARN (fusión a su vez de dos pequeñas moléculas de ARN, denominadas crRNA y tracrRNA) que dirige a la nucleasa Cas9 a cortar una determinada secuencia genómica gracias a la homología de secuencias entre la guía de ARN y el gen diana de ADN.

Mediante CRISPR es ahora posible generar modelos animales editados genéticamente, principalmente ratones, de forma mucho más rápida que antes, usando tecnologías tradicionales. Los métodos CRISPR aseguran la generación de múltiples líneas de animales editados portadores de las mutaciones deseadas (Harms *et al*., 2014; Seruggia y Montoliu, 2014). De forma similar muchas otras especies animales han podido ser ya editadas genomicamente mediante CRISPR. Mediante estrategias CRISPR es posible no solamente generar animales editados más rápidamente sino generar mutaciones específicas en regiones intergénicas, no codificantes, que habitualmente se habían resistido al análisis genómico funcional en modelos experimentales (Seruggia *et al*. 2015). En Biomedicina, los modelos animales de enfermedades pueden producirse ahora de forma mucho más alineada con las mutaciones que se diagnostican en los pacientes afectados por dichas patologías. Son los ratones avatar, portadores de la misma mutación genética detectada en pacientes. En Biotecnología es ahora posible trasladar a una especie de consumo, vegetal o animal, aquellas variantes genómicas existentes en la naturaleza (variedades o razas naturales) cuyas características aprovechables han podido ser asociadas a variaciones genéticas que, por lo tanto, son trasladables, mediante CRISPR, a las variedades existentes que se pretenden modificar. Existe ahora también la posibilidad de usar CRISPR para corregir, in vivo, las mutaciones genéticas que afecten a un individuo. Estos experimentos preliminares de terapia génica somática son muy prometedores y ya hay más de una docena de enfermedades congénitas raras que han podido ser tratadas, en modelos animales, pre-clínicamente, vehiculando los reactivos CRISPR a las células diana con ayuda de cápsulas virales AAV o utilizando nanopartículas (Fernández *et al*. 2017).

Sin embargo, no todo en el mundo CRISPR son ventajas y circunstancias positivas. También hay que ser consciente de sus limitaciones, de los problemas que presentan y para los cuales no tenemos todavía solución. Habitualmente, se suele pensar que el problema principal de las CRISPR es la posibilidad, cierta, que tienen de poder cortar en secuencias genómicas parecidas, pero no idénticas, a las inicialmente planeadas. Esto conlleva un riesgo y una cierta probabilidad de que genes no deseados resulten alterados tras una estrategia CRISPR. Una de las maneras de limitar al máximo este primer problema es mediante el desarrollo de nuevos algoritmos bioinformáticos que nos permitan seleccionar aquellas guías de ARN que sirvan para dirigir el corte de la nucleasa Cas9 de la forma más específica posible. Existen ya nuevos programas de diseño de guías que las seleccionan teniendo en cuenta todo el conocimiento acumulado, como por ejemplo Breaking-Cas, desarrollado en nuestro centro (Oliveros *et al*. 2016). El otro problema o limitación, mucho más

importante, es la posibilidad, también cierta, de que los reactivos CRISPR, gracias a su altísima procesividad, promuevan el corte de muchas moléculas de ADN y que cada una de ellas de repare de forma ligeramente distinta, generando una multiplicidad alélica, una diversidad genética que muy probablemente incluirá la variante deseada, aunque acompañada de muchas otras variantes no deseadas o no previstas. Esta es la principal limitación para el uso de CRISPR en clínica. Y por ello debemos ser prudentes en su uso potencial en pacientes humanos, no ya en embriones, que es un procedimiento ilegal en muchos países, como España, sino incluso en pacientes adultos afectados de patologías potencialmente tratables mediante CRISPR. Hay que promover el debate social para garantizar un uso responsable de estos avances tecnológicos en la clínica y, en general, en cualquier intento de editar animales o vegetales que existan en la naturaleza (Chneiweiss *et al*. 2017).

BIBLIOGRAFÍA

Chneiweiss H, Hirsch F, Montoliu L, Müller AM, Fenet S, Abecassis M, Merchant J, Baertschi B, Botbol-Baum M, Houghton JA, Kritikos M, Mifsud J, Bartnik E, Rath J, Druml C, Friedrich B, Carvalho AS, Lanzerath D, Saint-Raymond A. Fostering responsible research with genome editing technologies: a European perspective. Transgenic Res. 2017 Jul 20. doi: 10.1007/s11248-017-0028-z.

Mojica FJ, Montoliu L. On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals. Trends Microbiol. 2016 Oct;24(10):811-20.

Josa S, Seruggia D, Fernández A, Montoliu L. Concepts and tools for gene editing. Reprod Fertil Dev. 2016 Jan;29(1):1-7.

Fernández A, Josa S, Montoliu L. A history of genome editing in mammals. Mamm Genome. 2017 Jun 6. doi: 10.1007/s00335-017-9699-2.

Seruggia D, Montoliu L. The new CRISPR-Cas system: RNA-guided genome engineering to efficiently produce any desired genetic alteration in animals. Transgenic Res. 2014 Oct;23(5):707-16.

Harms DW, Quadros RM, Seruggia D, Ohtsuka M, Takahashi G, Montoliu L, Gurumurthy CB. Mouse Genome Editing Using the CRISPR/Cas System. Curr Protoc Hum Genet. 2014 Oct 1;83:15.7.1-27.

Seruggia D, Fernández A, Cantero M, Pelczar P, Montoliu L. Functional validation of mouse tyrosinase non-coding regulatory DNA elements by CRISPR-Cas9-mediated mutagenesis. Nucleic Acids Res. 2015 May 26;43(10):4855-67.

Oliveros JC, Franch M, Tabas-Madrid D, San-León D, Montoliu L, Cubas P, Pazos F. Breaking-Cas-interactive design of guide RNAs for CRISPR-Cas experiments for ENSEMBL genomes. Nucleic Acids Res. 2016 Jul 8;44(W1):W267-71.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CLINICAL APPLICATION OF PRONUCLEAR TRANSFER TO PREVENT MITOCHONDRIAL DNA DISEASE

Louise Hyslop, Newcastle Fertility Centre, Biomedicine West Wing, International Centre for Life, Newcastle NE1 4EP
Email: Louise.Hyslop@nuth.nhs.uk - Tel: 0191 213 8213

INTRODUCTION

Mitochondrial DNA (mtDNA) is maternally inherited with fertilized eggs containing more than 200,000 copies. If none of the copies of mtDNA have a mutation this is known as homoplasy and the mutation load of the oocyte is 0%. Whereas if a mutation is present in only some of the copies of mtDNA, this is known as heteroplasmy and the mutation load is the ratio of mutated to wild-type mtDNA. Pathogenic mtDNA mutations above a certain threshold of mutation load can cause a range of mitochondrial diseases. The severity of disease is determined by the mutation load with high risk of severe and life-threatening diseases with high mutation loads. The transmission of mtDNA disease is unpredictable because women who are heteroplasmic for a pathogenic mtDNA mutation can produce oocytes with widely varying mtDNA mutation loads due to a phenomenon known as the mtDNA genetic bottleneck (Carling *et al* 2011).

Assisted reproductive technologies have been developed to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. Pre-implantation genetic diagnosis (PGD) is suitable for women who produce embryos with low mutation loads and is offered in a small number of centres across the world. More recently, so called "mitochondrial donation" techniques such as pronuclear transfer (PNT) have been developed for women who consistently produce embryos with higher mutation loads. Pronuclear transfer involves the transplantation of the nuclear genome after fertilization when the haploid maternal and paternal genomes are separately packaged in clearly visible pronuclei. The pronuclei in a fertilized egg from an affected woman are transplanted to that of a donor fertilized egg which has had its pronuclei removed. It should be noted the risk of transmitting mtDNA disease is not eliminated since some mtDNA from the affected women oocyte is carried over during the transplantation of the pronuclei.

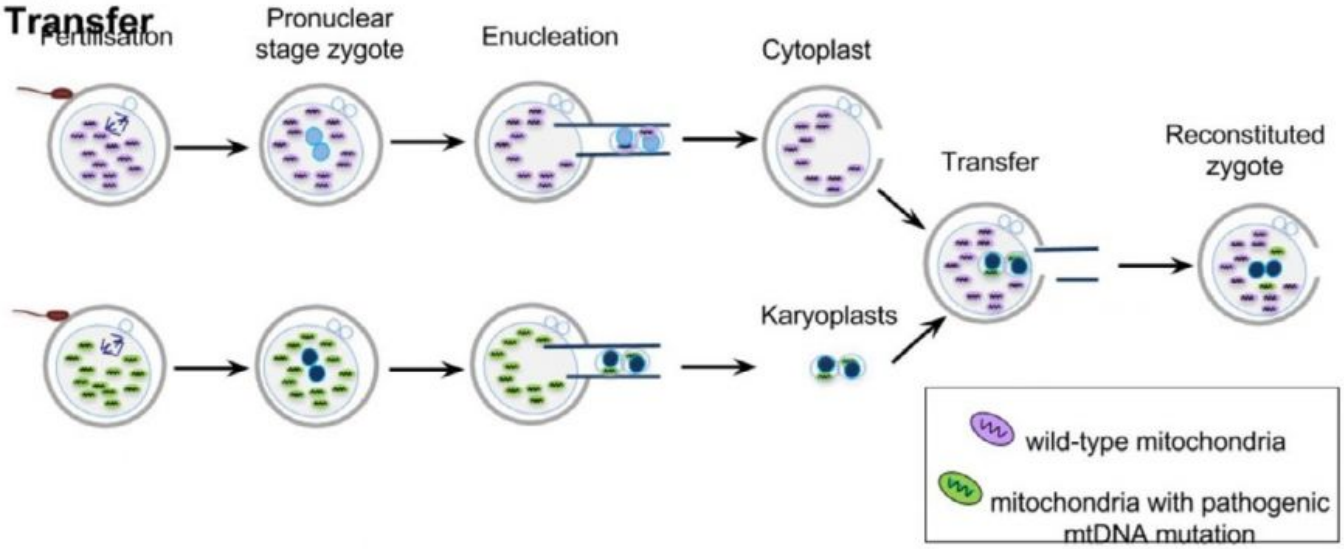
MATERIALS & METHODS

The materials and methods for the PNT procedure are available via Nature Protocol Exchange (Hyslop & Herbert, 2016). See figure 1 for a schematic of the PNT procedure. In summary, during the pronuclear transfer procedure each pronucleus is transferred in a membrane intact karyoplast and fused with the enucleated fertilized egg known as the cytoplast. To facilitate removal of each pronucleus the fertilised eggs were placed in enucleation medium with cytoskeletal inhibitors. After removal the most efficient method of fusion of the karyoplast and enucleated fertilized egg membranes is with the fusion reagent hemagglutinating virus of Japan envelope (HVJ-E). Following PNT the embryos were cultured to day 6.

RESULTS & DISCUSSION

Based on our preclinical research, viable blastocysts can develop following PNT although embryo development to the blastocyst stage is reduced (Hyslop *et al* 2016). We found there was no detectable effect on blastocyst development in control experiments when the pronuclei were removed but fused to reconstitute the fertilized egg. The reduced blastocyst development was detected following transplantation of the pronuclei between fertilized eggs from different egg donors. Whilst there was reduced

Figure 1: Schematic of Pronuclear Transfer



blastocyst development the blastocyst quality did not differ between the unmanipulated controls and PNT blastocysts. Moreover there was no detectable effect on chromosome segregation or gene expression.

Analysis of the PNT blastocysts revealed the amount of mtDNA co-transferred with the pronuclei accounted for 0-5% of the mtDNA content. Given the low levels of mtDNA carryover, pronuclear transfer has the potential to reduce the risk of mtDNA disease.

Following the publication of our preclinical research the independent expert panel was reconvened to perform the fourth scientific review of the safety and efficacy of mitochondrial donation. Based on the recommendations of the panel the Human Fertilisation and Embryology Authority (HFEA) approved cautious use of mitochondrial donation in the UK. In March 2017 the HFEA varied our clinics license for treatment to permit mitochondrial donation treatments using PNT.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to those who donated gametes for this research and we thank the research nurses M. Nesbitt and K. Lennox for obtaining consent.

The work was funded by the Wellcome Trust, and by grants from the NIHR Newcastle Biomedical Research Centre and the Barbour Foundation.

BIBLIOGRAPHY

Carling PJ, Cree LM, Chinnery PF. The implications of mitochondrial DNA copy number regulation during embryogenesis. Mitochondrion. 2011 Sep;11(5):686-92.

Hyslop LA, Blakeley P, Craven L, Richardson J, Fogarty NM, Fragouli E, Lamb M, Wamaitha SE, Prathalingam N, Zhang Q, O'Keefe H, Takeda Y, Arizzi L, Alfarawati S, Tuppen HA, Irving L, Kalleas D, Choudhary M, Wells D, Murdoch AP, Turnbull DM, Niakan KK, Herbert M. Towards clinical application of pronuclear transfer to prevent mitochondrial DNA disease. Nature. 2016 Jun 16;534(7607):383-6.

Hyslop LA & Herbert M. Pronuclear transfer in normally fertilised human embryos. Protocol Exchange. Published online: 15th June 2016.

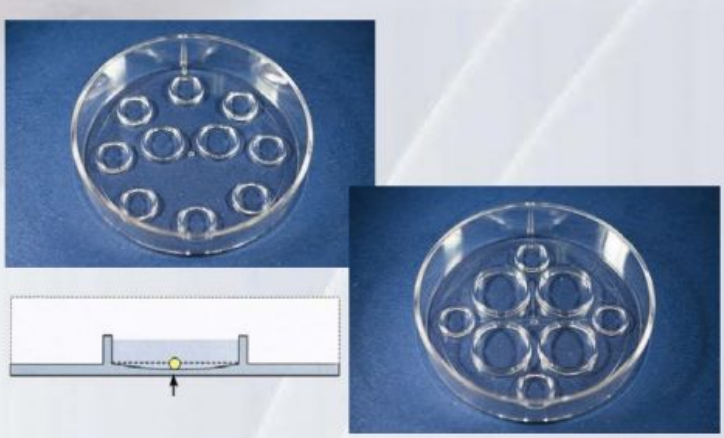
Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

Global® Medio Único

Ya es posible cultivar el Embrión hasta Blastocistos, sin cambio de medio. Más de 150 Estudios Clínicos publicados, a lo largo de 15 años, avalan los resultados.

Aceite LifeGuard® Oil

Aceite de alta densidad, que permite proteger eficazmente al embrión, de los cambios de pH y Temperatura.



Placas de cultivo GPS

- Diseño de pocillos cóncavos para la localización y valoración morfológica más rápida.
- Base totalmente plana para mejorar el intercambio de temperatura.
- Se pueden utilizar en incubadores de sobremesa
- Embryotestadas.
- Marcado CE y FDA

Medidor de pH epoc®

- Equipo portátil para la medición del pH
- Calibración automática interna
- No requiere buffers de calibración
- Resultados de la medición en 30 segundos
- Batería interna recargable

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

IMPROVING THE SAFETY AND EFFICIENCY OF THE HUMAN REPRODUCTION LABORATORY

Paola Vigano', Alessandra Alteri, Laura Corti, Elisa Rabellotti.
U.O. Obstetrics and Gynecology, San Raffaele Scientific Institute, Via Olgettina, 60, 20132 Milano – Italy.
E-mail: vigano.paola@hsr.it - Ph: +39.02.26436228, Fax: + 39.02.26434311

INTRODUCTION

As many as one in six couples experience subfertility at least once during their reproductive lifetime, IVF has rapidly evolved as the intervention of choice to help these couples, and has established itself firmly in modern day society. More than 700.000 IVF treatments are conducted worldwide each year. The success in assisted reproduction technology is crucially dependent on carefully controlled conditions in every aspect of the IVF laboratory routine.

Improvements are sought in every step of the procedure. In the IVF laboratory many things have changed in recent years with the idea of improving IVF success rates. Changes in culture conditions, fertilization methods, embryo selection methods, timing of transfer, and freezing protocols amongst many others. But whether these developments actually helped in achieving the goal of increasing IVF effectiveness is unclear. Health measures should be effective in terms of providing services based on scientific knowledge to all who could benefit and refraining from providing services to those not likely to benefit (avoiding underuse and misuse, respectively) and efficient in terms of voiding waste, including waste of equipment, supplies, ideas, and energy.

Good practice in IVF laboratories also requires a quality management programme that integrates quality control, quality assurance and quality improvement, and that monitors all procedures and components of the laboratory including not only pregnancy and implantation rates but also a systematic check and survey of all laboratory materials, supplies, equipment and instruments, procedures, protocols and staff performance (Alper, 2013; Magli *et al.*, 2008). In fact, IVF laboratories have a very high degree of complexity in terms of technology/equipment being used and type/number of tasks being carried simultaneously.

Possible problems may derive from instrumentation failures, to inaccurate data registration and the unconfirmed identification of gametes and embryos. Significantly, gametes and embryos belonging to a particular couple may be manipulated at different times by different embryologists. Other risk factors, such as very heavy workload and time pressure, might lead to errors or problems with severe or even catastrophic consequences. The "human" factor as a potential source of severe errors is indeed dominant in the IVF laboratory. Over the years, there have been numerous reports of misidentification, resulting at best in a cancelled cycle if the mistake was identified before embryo transfer, or in a tragedy if realized after the embryo transfer. There is therefore a need for approaches that systematically supervise the whole process and identify the causes of all errors, including potential errors (Dyer, 2004; Spriggs, 2003).

RESULTS

The list of techniques and procedures that have been brought into the IVF clinic over the last years is long and it continues to grow. To evaluate effectiveness and efficiency, the ideal paradigm for the introduction of new procedures or technologies implies initially their development in animals (Harper *et al.*, 2012). Whether animal studies are appropriate or not, research should then be performed on human gametes or embryos donated for research and with an appropriate risk assessment. Moreover, sufficiently powered RCTs need to show that there is a clinical benefit and that the technique is safe, with neonatal follow-ups if appropriate. For procedures that claim to increase delivery rates, RCTs are essential (Harper *et al.*, 2012). All deliveries need to be followed up to ensure that any risks are within an acceptable range. Considering the number of different procedures and treatments introduced in the laboratory practice, the number of published RCTs is very few.

For risk assessment, recently some groups including ours (Intra *et al.*, 2016) have focused on the Failure modes and effects analysis (FMEA) which is a proactive risk evaluation technique used to identify and eliminate known and/or potential failures, problems and errors from a system, design, process and/or service before they actually occur. Based on our analysis 11 individual steps in our IVF laboratory were identified, mapped and depicted in a comprehensive process map. All the steps had multiple failures identified and for the 11 main process steps analysed, 68 different potential failure modes and effects were identified. For each identified failure, embryologists were asked to estimate the (i) frequency of the failure, (ii) severity or impact of the failure and (iii) the likelihood of prior detection based on previous adverse event records and personal experience. Each failure mode was thus ranked by its frequency of occurrence (O), severity (S) and likelihood of detection (D) using a scale of 1 to 5. After the three critical elements had been determined, the risk priority number (RPN) was calculated. The magnitude of the RPN denotes the priority of the failure mode. The mode with the largest number has the greatest need for intervention. According to rank ordering by RPN score, corrective actions have been

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

set up to reduce the risk of failures. All the activities proposed to mitigate the impact of the failure were the result of open discussions or were based on suggestions derived from institutional or government courses (Italian National Transplant Centre) or mirrored successful experiences at other hospitals. Finally, the FMEA was repeated after 8 months and improved RPN after the corrective actions was calculated. As proof that the corrective actions applied exerted a positive influence on daily work, we have considered and examined three indicators: a technical indicator, a competence indicator and a traceability indicator. For the technical indicator, 8 months after FMEA implementation we observed an increase in oocyte cryopreservation procedures performed within 38 h after HCG administration (92%) compared to the 42% of oocyte cryopreservation procedures before the FMEA implementation. For competence indicator assessment, we have used a competency-based logbook, and following FMEA optimization, the minimum number of procedures with a desired outcome/process per year was increased to 30 in order to ensure high standards of competence of team members. Lastly, the percentage of documents signed by a witness represented the traceability indicator. After FMEA implementation, the totality of processes performed was double-checked and signed by two operators.

DISCUSSION

Embryologists should be encouraged to set up well-conducted studies, to validate the techniques used and to report their findings. One may argue that since it takes years to do the necessary research and development and obtain the results of RCTs, such an approach will dampen the development of the field but previous examples have shown that it is possible to introduce technology bringing no clinical benefit or even adverse effects (Gleicher *et al.*, 2014). On the other hand, huge amounts of potentially valuable data deriving from the performance of thousands of cycles all over the world using various laboratory approaches are probably never published. Proactive risk assessment methods should be considered in assisted reproduction technology laboratory to prevent risk associated with all activities.

REFERENCES

AlperMM.Experience with ISO quality control in assisted reproductive technology *FertilSteril2013*; 100: 1503-1508.

DyerC.Human error and systems failure caused IVF mix up. BMJ 2004; 328:1518.

Gleicher N, Kushnir VA, Barad DH. Preimplantation genetic screening (PGS) still in search of a clinical application: a systematic review. *ReprodBiolEndocrinol* 2014;12:22.

Harper J, Magli MC, Lundin K, Barratt CL, Brison D. When and how should new technology be introduced into the IVF laboratory? *Hum Reprod* 2012;27:303-313.

Intra G, Alteri A, Corti L, Rabellotti E, Papaleo E, Restelli L, Biondo S, Garancini MP, Candiani M, Viganò P. Application of failure mode and effect analysis in an assisted reproduction technology laboratory. *Reprod Biomed Online* 2016;33:132-139.

Magli MC, Van den Abbeel, E, LundinK, RoyereD, Van der ElstJ,GianaroliL. Committee of the Special Interest Group on Embryology. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories. *HumReprod*, 2008;23:1253-1262.

Spriggs M. IVF mixup: white couple have black babies. *J Med Ethics* 2003; 29: 65.

COMUNICACIONES ORALES

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-01: ESTUDIO COMPARATIVO DE FLUIDO FOLICULAR Y DEL PLASMA SEMINAL III: PRESERVACIÓN DE LA CALIDAD DEL ESPERMATOZOIDE

M Dorado Silva (1), C Torrado García (1), M González Martínez (2), J Bartolomé Nebreda (3), P Sánchez Martín (2), J Gosálvez Berenguer (3)
(1) GINEMED Huelva, (2) Ginemed Sevilla, (3) Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid

INTRODUCCIÓN

En la era del ICSI uno de los retos en biología de la reproducción es mantener los espermatozoides, una vez eyaculados, libres del impacto del daño iatrogénico. La generación de diferentes formulaciones de diluyentes seminales es una estrategia encaminada a reemplazar los efectos negativos del plasma seminal sobre el espermatozoide cuando se maneja en condiciones in vitro. El fluido folicular (FF) es la secreción natural que recibe al espermatozoide en las trompas durante la fertilización. El FF es crítico en la fisiología ovárica, dado que contiene proteínas, esteroides, carbohidratos y mucopolisacaridos que se presentan en proporciones variables a medida que sucede el crecimiento folicular. Los espermatozoides, inmersos en el FF, sufren cambios bioquímicos y funcionales y se hiper-activan hasta interaccionar con la zona pelúcida para conseguir penetrar en el ovocito. Dadas las características del FF, en el caso de los mamíferos, éste se podría utilizar como un medio capacitante in vitro.

OBJETIVO

Analizar el comportamiento dinámico de la motilidad y de la fragmentación del ADN en muestras seminales mantenidas en un medio comercial de preservación de calidad seminal y en FF.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio prospectivo observacional

Para analizar el efecto del FF en la calidad seminal en los parámetros seleccionados, se obtuvo el FF del primer folículo que se extrajo. Para ello, se seleccionó un folículo con un tamaño mayor de 16 mm y fue recogido individualmente. El FF, una vez aislado el ovocito, se colectó en un tubo cónico y se centrifugó a 350 g durante 10 min. Posteriormente se inactivó a 56ºC durante 30 min.

Las muestras de semen se analizaron separando el eyaculado total en varias fracciones: NETO (control), NETO en medio de cultivo (Quinn's Advantage™ Medium with HEPES (HTF) Sage, Denmark) y NETO en medio de cultivo con FF al 20% y 50%, (HTF20 y HTF50) respectivamente. Las dinámicas de movilidad y fragmentación espermática se estudiaron a tiempo 0 (t0h), a las 3 horas (t3h) y a las 24 horas (t24h) de incubación a temperatura ambiente. La motilidad se analizó con una cámara Makler por un embriólogo. La fragmentación del ADN espermático se realizó con el kit dynHalosperm (Halotech DNA, Madrid). Tanto para la motilidad como para el estudio de la longevidad del ADN (fragmentación dinámica del ADN) se calculó el Ratio de pérdida/incremento de calidad por hora (unidades/hora: u/h). El Ratio de perdida de movilidad a las 3h sería: Rm=(valor t0h-valor t3h)/3h. El Ratio de incremento de fragmentación (Rf) sería equivalente.

RESULTADOS

En el caso de la motilidad, los decrementos observados a las 3h fueron: NETO:Rm=5,6 u/h; HTF:Rm=2,2 u/h; HTF20: Rm=0.3u/h; HTF50: Rm=1,1 u/h. Con respecto a la fragmentación, los valores del incremento de fragmentación fueron: NETO: Rf=1,2 u/h; HTF: Rf=2,2 u/h; HTF 20: Rf= -1,8 u/h; HTF50; Rf=1,1 u/h.

En el caso de la incubación a 24h, los valores de pérdida de movilidad fueron muy elevados, mientras que los incrementos de la fragmentación eran notablemente inferiores en el caso de HTF20 y HTF50.

CONCLUSIONES

Durante las tres primeras horas de co-incubación de los espermatozoides en HTF20 0 HTH50 se observa un menor impacto de la perdida de movilidad de los espermatozoides y una ralentización de la degradación del ADN espermático. La prevención de la degradación del ADN espermático es notoria incluso tras 24h de incubación.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-02: EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE LAVADO SEMINAL PARA LA ELIMINACIÓN DE VIRUS ZIKA EN EYACULADO

M Guimerà Leal, A Peiró Mestres, M Dalmau Quera, S Cívico Vallejos, V Gonzalo Abril, G Casals Soler, V Moreno Folch, JM Calafell Pozo, E Vidal Sordé, MJ Martínez Yoldi
HOSPITAL CLÍNIC, Barcelona

INTRODUCCIÓN

El virus del ZIKA (VZIK) es un arbovirus del género Flavivirus que puede transmitirse por contacto sexual y por vía transplancentaria durante el embarazo, pudiendo causar microcefalia y otras anomalías graves en el feto. Se ha detectado RNA vírico en eyaculado hasta 6 meses después de la aparición de los síntomas, aunque gran parte de los pacientes infectados por VZIK se muestran asintomáticos y todavía se desconoce la persistencia de VZIK en el semen de estos varones. Independientemente de seguir las recomendaciones para prevenir la infección por el VZIK en pacientes con búsqueda gestacional tributarios de técnicas de reproducción asistida (TRA), se desconoce si las técnicas de lavado seminal pueden minimizar el riesgo de transmisión del virus a la madre y al feto ante un posible embarazo.

OBJETIVO

1- Determinar si los protocolos de lavado seminal en muestras infecciosas para TRA son eficaces para eliminar el RNA vírico en muestras seminales VZIK positivas.
2- Determinar la viabilidad e infectividad del VZIK tras el lavado seminal.

MATERIAL Y MÉTODO

Se inocularon 4 muestras seminales normozoospérmicas con una cepa de VZIK aislada de un caso de aborto inducido por VZIK. Todas las muestras fueron procesadas según la técnica de doble lavado seminal validada en pacientes con VIH utilizando gradientes de densidad discontinuos en combinación de 40/80% seguido de swim up. Posteriormente, el RNA viral se analizó mediante RT-PCR a tiempo real y la presencia de virus infeccioso se detectó mediante cultivo celular en distintas fracciones de las muestras procesadas: 1. Plasma seminal (PL); 2. Gradientes 40% y 80% respectivamente (G40, G80); 3. Fracción final de espermatozoides recuperados en el swim up (SPZ).

RESULTADOS

Los resultados de la RT-PCR se presentan a continuación: [TABLA 1]

MUESTRA	RT-PCR (Ct*)	CULTIVO
PL-1	14.10	Positivo
PL-2	15.76	Positivo
PL-3	16.23	Positivo
PL-4	INDETECTABLE	Negativo
G40-1	20.66	Positivo
G40-2	21.12	Positivo
G40-3	20.04	Positivo
G40-4	INDETECTABLE	Negativo
G80-1	21.50	Positivo
G80-2	20.43	Positivo
G80-3	21.06	Positivo
G80-4	INDETECTABLE	Negativo
SPZ-1	29.85	Positivo
SPZ-2	28.11	Positivo
SPZ-3	30.75	Positivo
SPZ-4	INDETECTABLE	Negativo

Inoculación: las muestras .1, .2 y .3 fueron inoculadas respectivamente con 0.5, 0.25 y 0.125 ml de un cultivo de VZIK (Ct:12,6). Las muestras .4 se inocularon con medio de cultivo (control negativo).

*Ct (Threshold cycle): número de ciclos de amplificación necesarios para detectar RNA vírico en la muestra testada. Es inversamente proporcional a la carga viral.

Si bien la carga viral en la fracción final de SPZ es inferior respecto al observado en las fracciones de PL y G40/80, el estudio mediante RT-PCR mostró presencia de VZIK en todas las muestras testadas, a excepción de las muestras control. Además, se detectó la presencia de virus con capacidad infectiva en todas las fracciones de SPZ de las muestras inoculadas con VZIK.

CONCLUSIONES

El lavado de semen para muestras infecciosas como el VIH es una técnica segura que permite la eliminación del virus para TRA. Por el contrario, nuestros resultados sugieren por primera vez que en muestras seminales positivas para el VZIK, la aplicación de dicha técnica no eliminaría el virus en la fracción de espermatozoides destinados a TRA, al menos cuando el virus está presente en grandes cantidades. Estudios adicionales son necesarios para confirmar el riesgo de transmisión del VZIK en TRA.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-03: NIVELES DE MARCADORES APOPTÓTICOS EN SUERO Y LÍQUIDO SEMINAL EN VARONES CON ALTERACIONES ESPERMÁTICAS

R Núñez Calonge(1), S Cortés Gallego(1), L Ortega López(1), LM Gutiérrez González(2), R Kireev(3)
(1) Clínica Tambre, Madrid, (2) Universidad Alfonso X el Sabio, Madrid, España, (3) Instituto de Investigación Sanitaria Galicia Sur, Vigo, España

INTRODUCCIÓN

Se han realizado muchos trabajos para conocer la patogénesis de la oligozoospermia y astenozoospermia, algunos de los cuales sugieren una relación con las señales apoptóticas mitocondriales y la infertilidad masculina.

Un componente importante de la apoptosis dependiente de las mitocondrias es la asociación entre radicales libres y factores inductores de apoptosis, como lo demuestra el hecho de que varios desórdenes espermáticos están asociados a un aumento de las especies reactivas de oxígeno.

El citocromo c del citosol activa el complejo apoptosoma, iniciando la reacción de las caspasas 9. La escisión de las caspasas en citoqueratinas (CKs), poli (ADP-ribosa) polimerasa y la activación de endonucleasas (para generar ADN nucleosómico (nDNA)) forman una cascada de eventos irreversibles y conducen a la formación de cuerpos apoptóticos. También se promueve la exposición de la fosfatidilserina en la superficie externa de la membrane plasmática, lo cual permite que se produzca el reconocimiento de la célula muerta por los fagocitos.

Por otra parte, el factor mieloide de leucemia (Myeloid cell leukemia-1) (Mcl-1) es un miembro de la familia de proteínas Bcl-2 implicada en la regulación anti-apotótica a varios niveles.

OBJETIVO

El objetivo del presente estudio ha sido investigar el papel de marcadores relacionados con la apoptosis: citocromo C (Cyt C), citoqueratina-18 (KRT), DNA nucleosomal (nDNA) y myeloid cell leukemia-1 (MCL-1) en varones con alteraciones espermáticas, en comparación con controles normozoospérmicos

MATERIAL Y MÉTODO

Se han incluido en este estudio 39 casos de varones con edades comprendidas entre los 19 y los 65 años, con una media de 32,31 años (SD: 9,31), 25 de los cuales, un 65,7%, presentan normozoospermia y los otros 14, un 34,3%, tienen una muestra seminal patológica, por asteno u oligoastenozoospermia.

Los niveles de Cyt C, KRT-18, nDNA y MCL-1 se midieron tanto en suero como en plasma seminal obtenido tras centrifugar los eyaculados, por ELISA kit. Los niveles de nDNA en las mismas muestras fueron medidas por Cell Death ELISA kit. Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante el test ANOVA.

RESULTADOS

Los análisis realizados en suero demostraron unos mayores niveles de Cyt C (0,23±0,0183 en donantes; 0,32±0,002 en pacientes, $p<0,001$), nDNA (0,00076±0,000012 en donantes y 0,00245±0,00025 en pacientes; $p<0,05$) y menores de MCL-1 en pacientes (0,0021±0,00012 en donantes y 0,0011±0,000014 en pacientes; $p<0,01$).

Las determinaciones en muestras de líquido seminal determinaron, así mismo unos niveles de MCL-1 mayores en donantes (0,1297±0,054 en donantes y 0,026±0,0034 en pacientes; $p<0,01$), menores niveles de KRT 18 en donantes (3,579±0,44 en donantes y 9,765±1,08 en pacientes; $p<0,001$) y altos niveles de Cyt C en pacientes (0,884±0,054 en donantes y 1,854±0,12 en pacientes; $p<0,01$).

CONCLUSIONES

A la vista de estos resultados, se puede concluir que los radicales libres podrían estar implicados en la baja concentración y movilidad espermática de varones infértiles a través de la vía de señales apoptóticas mitocondriales. La liberación alterada de Cyt C, nDNA y KRT-18 y bajos niveles proteína anti-apoptotica (MCL-1), podría ser una característica molecular de varones con oligozoospermia y astenozoospermia, aunque se necesitarían más casos para llegar a conclusiones más definitivas.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-04: EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A DISRUPTORES ENDOCRINOS SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA Y LA TASA DE ANEUPLOIDAS EN DONANTES DE SEMEN

I Campos Galindo (1), F Domínguez Hernández (2), R Rivera Egea (3), N Garrido Puchalt (2), V Peinado Cervera (1), C Simón Vallés (4), C Rubio Lluesa (1) (1) IGENOMIX Spain, Paterna, Valencia, (2) Fundación IVI, Valencia, España, (3) IVI Valencia, Valencia, España, (4) Obs/Gyn Dept., Valencia University/INCLIVA; Igenomix; Ob/Gyn Dept., Stanford University; Ob/Gyn Dept., Baylor College of Medicine, Valencia, Spain

INTRODUCCIÓN

Los disruptores endocrinos (DE) son sustancias químicas, naturales o artificiales, que pueden interferir con el sistema endocrino alterando la síntesis, secreción, transporte, unión, acción o eliminación de hormonas naturales. Se encuentran en muchos productos domésticos e industriales. El papel central de los estrógenos en el sistema reproductivo ha sugerido que la exposición a DE, que imitan el efecto biológico del estradiol, podría ser causa de trastornos reproductivos.

OBJETIVO

Evaluar si la exposición a DE podría afectar la calidad espermática y a la tasa de aneuploidía en donantes de semen.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio prospectivo observacional que incluye 25 donantes masculinos con fertilidad probada y cariotipo normal. Se recogieron dos muestras de orina, una de sangre y una de semen fresco. Se midieron los niveles de bisfenol A, metilparabeno, propilparabeno, mono(2-etilhexil) ftalato, genisteína, daidzeína, cadmio, plomo, mercurio, cafeína y cotinina (mediante UPLC-MS para DE e ICP-MS para metales). La exposición a DE fue evaluada utilizando un cuestionario de 40 ítems. Los parámetros espermáticos analizados fueron: volumen de eyaculado, concentración y porcentaje de espermatozoides progresivos, no progresivos e inmóviles. En las muestras de semen realizó FISH para el análisis de los cromosomas X, Y, 13, 18 y 21. Se informaron los porcentajes de disomías para cromosomas sexuales y autosomas y las tasas totales de diploidía.

RESULTADOS

Se encontraron varias correlaciones significativas entre el estilo de vida y la calidad espermática y la tasa de aneuploidía. El aumento de la ingesta de productos relacionados con la soja se relacionó con el aumento del porcentaje de disomías para los cromosomas sexuales (p=0,050 para el yogur de soja y p=0,044 para los brotes de soja) y autosomas (p=0,041 para miso, tofu y p=0,047 para los brotes de soja). El consumo de soja también se asoció con mayor volumen eyaculado (p=0,024 para miso y tofu); mayor porcentaje de espermatozoides inmóviles (p= 0,030 para la leche de soja) y disminución de los espermatozoides progresivos (p=0,045 para la leche de soja). Los niveles más altos de daidzeína en el plasma seminal se asociaron a un aumento significativo en la diploidía total (p=0,008). Se encontró un aumento de disomías autosómicas con mayores niveles de daidzeína en orina (p=0,031) y plasma seminal (p=0,004). El aumento de los niveles de genisteína en el plasma seminal se correlacionó significativamente con el aumento de las disomías de los cromosomas sexual (p=0,027) y el volumen eyaculado (p=0,025). También se encontró una correlación entre m-parabeno en el plasma seminal y el porcentaje de espermatozoides no progresivos (p=0,003); Y entre el aumento de la orina p-parabeno y el aumento de disomías de cromosomas sexuales (p=0,008). Los niveles de orina de MEHP se correlacionaron con la concentración de espermatozoides (p=0,035). Se observó una relación ligeramente significativa entre la concentración de plomo y el porcentaje de disomías del cromosoma 18 y el porcentaje de diploides.

CONCLUSIONES

Nuestro estudio muestra el impacto del estilo de vida y los niveles de DE sobre la calidad espermática y la tasa de aneuploidías en espermatozoides. Estos resultados son aplicables a una población control de donantes fértiles, con niveles moderados de DE. Se debe tener en cuenta que estamos expuestos a DE que se encuentran en nuestra rutina diaria, el medio ambiente y los alimentos, por lo que en la población infértil se pueden encontrar niveles más elevados que se podrían relacionar con sus problemas reproductivos.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-05: CARACTERIZACIÓN DE LA CARGA DE PROSTASOMAS PRESENTE EN EL PLASMA SEMINAL DE MUESTRAS NORMOZOOSPÉRMICAS VS PATOLÓGICAS

A García Rodríguez (1), M de la Casa (2), MI Pacheco (3), J Gosálvez (1), H Peinado (4), D Olmos (5), R Roy (1)
(1) Universidad Autónoma de Madrid, (2) Clínica GINEFIV, Madrid, (3) Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas. Unidad de Investigación en Cáncer de Próstata, Madrid, (4) Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas. Departamento de Oncología Molecular. Laboratorio de Microambiente y Metástasis, Madrid, (5) Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas. Unidad de Investigación en Cáncer de Próstata. Madrid

INTRODUCCIÓN

Los prostasomas son vesículas extracelulares tipo exosoma generadas en el epitelio prostático a partir de cuerpos multivesiculares y liberadas durante la eyaculación al plasma seminal, donde aparecen en gran concentración. Se ha descrito que participan en licuefacción, capacitación y reacción acrosomal, que incrementan la motilidad y que tienen funciones antioxidantes, antibacterianas, coagulantes e inmunosupresoras.

OBJETIVO

Caracterizar la carga en prostasomas presente en el plasma seminal y comparar entre muestras normozoospérmicas vs muestras patológicas.

MATERIAL Y MÉTODO

Se seleccionaron 12 muestras seminales diagnosticadas como normozoospérmicas y 14 diagnosticadas como patológicas según criterios de la OMS 2010. La carga de prostasomas de cada muestra se aisló mediante el método de centrifugación diferencial (500g 10min, 3000g 20min, 12000g 20min, 100000g 70min) seguido de un lavado con PBS 1x a 100000g 70min). Cada pellet de prostasomas obtenido se resuspendió en 200µl de PBS 1X. Primeramente se realizó una caracterización morfológica de los prostasomas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y análisis de imagen de partículas (NANOSIGHT). Seguidamente se caracterizó el contenido proteico de los prostasomas mediante espectrometría de masas cuantitativa (iTRAQ).

RESULTADOS

Para las 26 muestras se aisló la carga de prostasomas con éxito, obteniendo una media global de partículas de 1.30E+13/ml y de diámetros de 146nm. A nivel microscópico no se observaron grandes diferencias en cuanto a la morfología de los prostasomas, apareciendo siempre dos subpoblaciones, una de mayor tamaño y electrodensa y otra de menor tamaño y electrosuave, pero sí se observó una mayor presencia de restos lipídicos y cuerpos multivesiculares en los aislados de muestras normozoospérmicas. Para los parámetros morfológicos obtenidos con el NANOSIGHT se observó que de media los aislados de muestras normozoospermicas presentan menor concentración de prostasomas (2.47E+12 vs 4.02E+12) y menor diámetro (143nm vs 148nm) aunque dichas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

A nivel de contenido proteico, en el conjunto de las 26 muestras se detectó un total de 1282 proteínas diferentes de las cuales 741 aparecieron en todas las muestras (57.8%), incluidos 4 marcadores específicos de prostasomas (Prostatic acid phosphatase, Prostate specific antigen, Transmembrane protease serine type 2 y Aminopeptidase). Las proteínas comunes se clasificaron mediante el uso de sus correspondientes anotaciones GO-Ontology:

- Función molecular: 52.1% son proteínas con actividad catalítica y 28.7% proteínas de unión.
- Procesobiológico:aproximadamente 25% son proteínas implicadas en procesos celulares y otro 25% proteínas implicadas en procesos metabólicos. Menos de un 1% son proteínas implicadas en procesos reproductivos.
- Componente celular: 43% son proteínas estructurales, 25% forman parte de orgánulos y un 12% son proteínas de membrana.

Al comparar las muestras normozoospérmicas con las patológicas se encontraron 5 proteínas con expresión exclusiva: 2 proteínas detectadas en todas las normozoospérmicas pero no en las patológicas (Ras-related protein Rab-22A y 26S protease regulatory subunit 10B) y 3 proteinas detectadas en todas las patológicas pero no en normozoospérmicas (Charged multivesicular body protein 2b, Exportin-1 y 40S ribosomal protein S19). Por otro lado, se detectan 62 proteínas con expresión diferencial entre muestras normozoospérmicas y muestras patológicas: 54 con mayor expresión en normozoospermicas y 8 con menor expresión. Destacamos la Epididymal sperm binding protein (sobreexpresada en normozoospérmicas) y la Prosaposin (subexpresada en normozoospérmicas), ambas implicadas en los procesos reproductivos.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CONCLUSIONES

El plasma seminal presenta una carga elevada de prostasomas cuyas características morfológicas varían poco si son muestras normozoospermicas o patológicas. Por contra, si se observan variaciones interesantes en el contenido proteico de los prostasomas de muestras normozoospermicas y de patológicas, especialmente en cuanto a niveles de expresión, mostrando los primeros un patrón de sobreexpresión proteica.

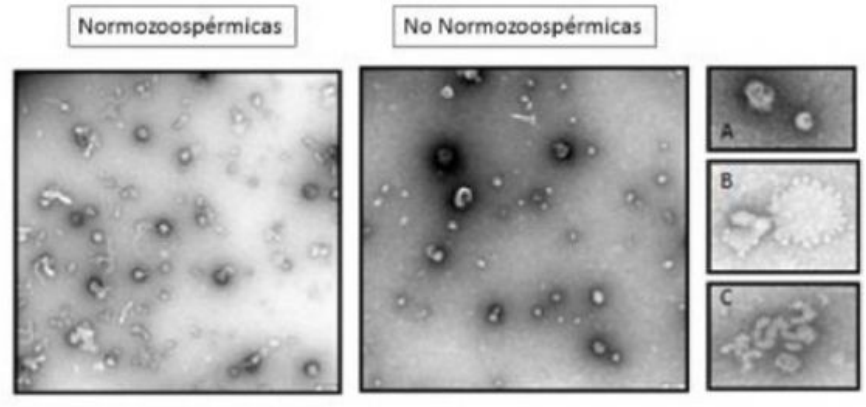


Figura 1: Imágenes de TEM de 2 pellets de protosomas, uno de muestra normozoospérmica y otro de muestra no normozoospérmica. Se observa como ambos pellets presentan 2 subpoblaciones similares de prostasomas: una de mayor tamaño y electrodensa y otra de menor tamaño y electrosuave (ampliado en A) pero también se observa una mayor presencia de restos lipídicos (B) y cuarpos multivesiculares (C) en los aislados de muestras normozoospérmicas.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-06: VALORACIÓN DEL AREA MEDIA DE LA CABEZA ESPERMÁTICA COMO POSIBLE INDICADOR PARA SOLICITAR FISH EN ESPERMATOZOIDES

J Bataller Sánchez (1), A Barberá Alberola (1), X Vendrell Montón (2), M Ruiz Jorro (1), C Calatayud Lliso (1)
(1) CREA. Centro Médico de Reproducción Asistida, Valencia, (2) Sistemas Genómicos, Paterna, Valencia

INTRODUCCIÓN

La aneuploidía espermática está relacionada con peor capacidad fecundante, alteraciones en el desarrollo embrionario, mayor probabilidad de aborto y de alteraciones cromosómicas en el feto y recién nacido. La incidencia de aneuploidías en espermatozoides suele ser valorada mediante FISH. Las indicaciones para solicitar esta prueba suelen ser clínicas, (aborto de repetición, fallo de implantación, desarrollo embrionario inadecuado...). Las indicaciones basadas en valores extraídos exclusivamente del espermiograma, no están tan claramente relacionadas con la probabilidad de FISH alterado. Algunos artículos han relacionado un tamaño aumentado de la cabeza espermática (macrozoospermia) con mayor probabilidad de FISH alterado, pero esta valoración es claramente subjetiva y no existe un parámetro de referencia de normalidad.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio ha sido valorar si el cálculo del Área Media de la Cabeza de los Espermatozoides (AMCE) está relacionado con la probabilidad de FISH alterado. Si esto fuera así, podríamos contar con un valor objetivo relacionado con probabilidad de aneuploidía.

MATERIAL Y MÉTODO

Para la realización del estudio se utilizaron 220 muestras de pacientes en los que existía una indicación clínica para solicitar FISH, y 20 muestras de donantes con fertilidad probada. Se calculó el AMCE a partir de la medición del área de la cabeza de 200 espermatozoides (ISAS, PROISER). Este análisis se realizó en dos muestras de semen de cada individuo obtenidas con 15 días de diferencia, comprobándose que es un dato altamente estable y repetitivo. Se realizó FISH mediante sistema automático (Metafer 4), valorándose diploidías, disomías y nulisomías en cromosomas 13, 18, 21, X e Y y en al menos 2000 espermatozoides por sonda. Se realizó un análisis estadístico para valorar si existía alguna relación entre AMCE y FISH.

RESULTADOS

El análisis estadístico mediante un modelo de regresión logística muestra una relación entre el AMCE y la probabilidad de FISH alterando. Se ha observado una mayor probabilidad de FISH alterado (57%) a partir de una AMCE de 14 micras cuadradas. El AMCE medio en las poblaciones analizadas fue de 12,7 µ2 para donantes fértiles, 12,6 µ2 para pacientes con FISH normal y 13,28 µ2 para pacientes con FISH alterado

CONCLUSIONES

El AMCE puede aportar un valor objetivo de macrozoospermia directamente relacionado con la probabilidad de FISH alterado y podría ser una nueva indicación para solicitar FISH en espermatozoides. Son necesarios más estudios para valorar el impacto de la morfología espermática sobre las diferentes aneuploidias.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-07: VALIDACIÓN DE UN NUEVO MÉTODO DE DETECCIÓN DE ROTURAS DE DOBLE CADENA DE ADN ESPERMÁTICO MEDIANTE EL MARCADO DE GAMMA-H2AX Y EL ANÁLISIS CON MICROSCOPÍA DE EPIFLUORESCENCIA

M Ruiz Jorro, J J Bataller, E Berenguer, A Barberá, C Calatayud
CREA - Medicina de la Reproducción, Valencia

INTRODUCCIÓN

El ADN del espermatozoide puede sufrir daño de diferente consideración. Puede presentar una pérdida de nucleótidos en uno de los dos pares de bases complementarios (rotura de simple cadena - RSC), o puede presentar una pérdida de los dos pares de bases complementarios (rotura de doble cadena - RDC). Muy pocas técnicas diagnósticas distinguen roturas de simple cadena y roturas de doble cadena y la importancia clínica de hacerlo reside en que las RSC se asocian con menor capacidad de fecundación del espermatozoide, mientras que las RDC se asocian con mayor riesgo de aborto y mayor probabilidad de alteración en la información genética del embrión.

H2AX es una de las histonas que participan en el empaquetamiento del ADN. Cuando se produce una rotura de doble cadena se fosforila el residuo Ser-139 y la H2AX se convierte en Gamma-H2AX. En células somáticas, Gamma-H2AX es clave para la detección y reparación de las roturas de doble cadena. Los espermatozoides, pierden gran parte de las histonas en el proceso de protaminación, pero queda un número de ellas, alrededor de las cuales es posible que se encuentra la fracción del ADN que es fundamental para el inicio de los procesos de fecundación y activación ovocitaria (Sillaste y cols 2017).

La gran mayoría de protocolos actuales para la detección de Gamma-H2AX necesitan de un clitómetro de flujo. Su visualización mediante microcopio de fluorescencia está dificultada por la escasa cantidad de histonas en espermatozoides y el difícil acceso del marcador a la histona por el denso empaquetado del ADN sobre ella. Revelar su marca mediante immunoquímica resulta muchas veces complicado.

OBJETIVO

El objetivo del presente estudio fue adaptar y modificar el protocolo de detección de Gamma-H2AX para mejorar su visualización mediante microscopia de epifluorescencia.

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron una total de 47 muestras se semen en las cuales se realizó REM mediante gradientes de densidad y se fijaron con 4% de formaldehido. Posteriormente se sembraron en portaobjetos multipocillos, tras lavado se permeabilizaron con Tritón. Posteriormente se incubó overnight con anticuerpo primario anti Gamma H2AX (Phospho Histone H2A.X pSer 140 (Invitrogen) tras cuyo lavado se incubó con anticuerpo secundario. Se analizaron además diferentes condiciones de incubación con nucleasas (DNAasa R Nase-free Thermo Scientific). Tras la incubación se realizó el protocolo de immunoquímica para gamma-H2AX mediante microscopia de epifluorescencia. Se contaron 200 espermatozoides como mínimo por pocillo.

RESULTADOS

Se observaron que en las pocillos control sin nucleasa el porcentaje y la señal de espermatozoides marcados con gamma-H2AX era más bajo que en aquellos pocillos donde se incubo con nucleasa, así mismo se observó que no existía variación significativa entre los valores de gamma-H2AX para diferentes tiempos de incubación, ni para diferentes concentraciones, por lo que no se produce ninguna interacción entre la nucleasa y gamma-H2AX.

CONCLUSIONES

La técnica desarrollada permite hacer una determinación, con microscopía de epifluorescencia, del porcentaje de espermatozoides marcados con Gamma-H2AX. La novedad de este protocolo es que ofrece una estimación de la incidencia de roturas de doble cadena de ADN, interrogando las marcas en las histonas y deshaciéndose previamente del propio ADN, mejorando así la accesibilidad del anticuerpo al sitio de unión de la histona H2AX y aportando un resultado más evidente.

La validación de este análisis como posible indicador de diferentes parámetros reproductivos requiere la realización de estudios clínicos prospectivos que demuestren su eficacia.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-08: MODELOS PREDICTIVOS DE CALIDAD EMBRIONARIA MEDIANTE EL USO RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

MA Vilches Ferron (1), AC Abreu (2), FM Arrabal Campos (2), LM Aguilera Saez (2), I Fernandez de las Nieves (2)
(1) Complejo Hospitalario Torrecardenas, Almería. (2) Universidad de Almería, Almería

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, ha aumentado el interés en el uso de técnicas metabolómicas basadas en resonancia magnética nuclear (RMN) para la identificación de biomarcadores asociados a un desarrollo embrionario exitoso. A pesar de ello, existen aún pocos estudios concluyentes en esta área. Este hecho se debe a la gran dificultad para poder desarrollar este tipo de investigaciones fundamentalmente por motivos éticos y por el tipo y volumen de muestra limitada que hay que manipular. El presente estudio aborda la aplicación de la RMN acoplada a técnicas estadísticas multivariantes en medios de cultivo embrionario con el objeto de asistir en la selección embrionaria, en el momento de la transferencia, que directamente supondrá una mejora en la tasa de implantación, embarazo y tasa de RNV (recién nacido vivo).

OBJETIVO

La aplicación de métodos espectroscópicos basados en RMN y de métodos estadísticos de análisis multivariante para el desarrollo de modelos predictivos de calidad embrionaria.

MATERIAL Y MÉTODO

Se trata de un estudio transversal con una elevada componente de tipo analítico, y con una selección y asignación aleatoria de los medios de cultivo. Se pretende mejorar la tasa de éxito, a través de la construcción de un modelo predictivo de calidad embrionaria asignada durante el desarrollo del preembrión. La calidad del preembrión se asocia al estudio morfológico del mismo por visualización microscópica, siendo la de mayor implantación, la de calidad embrionaria A (según criterios ASEBIR). El medio de cultivo libre de preembrión se recoge minuciosamente tras cada periodo de incubación (D+2 y D+3), y es congelado a -20ºC para posteriormente realizar los estudios de metabolómica. Las muestras de RMN se prepararon en una disolución de NaCl (0.09%) en D2O. Las medidas se llevan a cabo en un espectrofotómetro Bruker Avance III HD 600 equipado con criosonda QCI-P y empleando en la adquisición de datos la secuencia 1H CPMG. Los espectros obtenidos fueron procesados a través del software TOPSPIN 3.2 (Bruker BioSpin GmbH) y a continuación fueron sometidos a un análisis multivariante usando el software SIMCA-P (v. 14.0, Umetrics).

RESULTADOS

Este estudio ha demostrado que es posible obtener modelos discriminatorios para el diagnóstico de calidad embrionaria mediante la conjugación de la RMN de alta sensibilidad con herramientas estadísticas de análisis multivariante. Se ha podido identificar una serie de biomarcadores asociados a calidad embrionaria tras las primeras 18 horas de cultivo. Además, se han obtenido varios indicadores basados en la relación de metabolitos específicos para la fiable clasificación de los distintos tipos de embriones.

CONCLUSIONES

El perfil metabolómico de los medios de cultivo embrionario, se ha correlacionado de forma exitosa con el potencial reproductivo de los embriones, lo que permitirá mejorar la tasa de eficiencia de las técnicas de FIV y, en especial, incrementar el número y calidad de los blastocistos formados.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-09: MARCADORES SUBCELULARES DE MADURACIÓN CITOPLASMÁTICA EN OVOCITOS HUMANOS

A Ferrer Vaquer, M Barragán Monasterio, AM Nicolau, A Rodríguez Aranda, R Vassena
Clínica EUGIN, Barcelona

INTRODUCCIÓN

Aproximadamente 15% de los ovocitos obtenidos por punción folicular son inmaduros (estadio VG o MI). La maduración in vitro de ovocitos MI permite incrementar el número de ovocitos disponibles para fertilización y, si los embriones tuvieran calidad suficiente, aumentar las posibilidades de embarazo cumulativo por ciclo iniciado. Para la adquisición de competencia al desarrollo ovocitaria es necesaria la correcta maduración tanto nuclear como citoplasmática. Mientras que la maduración nuclear se determina por la extrusión del corpúsculo polar, no existe una caracterización detallada de los diferentes marcadores citoplasmáticos. Estos parámetros pueden verse alterados durante la maduración in vitro de los ovocitos, afectando así a su competencia.

OBJETIVO

Estudio comparativo a nivel subcelular de ovocitos MII madurados in vivo y MI cultivados in vitro a fin de definir la competencia citoplasmática durante la maduración in vitro.

MATERIAL Y MÉTODO

Este estudio incluye ovocitos procedentes de ciclos de donación de óvulos, las donantes incluidas en el estudio tenían edad media de 25,84 (SD 4,40) y un IMC de 21,39 (SD 2,49). Ovocitos MII madurados in vivo fueron analizados por inmunofluorescencia y/o tinción in vivo para los diferentes componentes intracelulares. La distribución y potencial de membrana de las mitocondrias se midió por tinción in-vivo de JC-1 (Calbiochem) y la disposición del retículo endoplasmático con tinción in-vivo de ER-Tracker Red (Molecular Probes), los gránulos corticales se observaron con tinción de lectina (LCA, Fluorescein Lens Culinaris Agglutinin, Vector Laboratories) y el citoesqueleto de actina con tinción de faloidina (Alexa Fluor 568 Phalloidin, Molecular Probes). La longitud y localización del huso meiótico se midió por inmunofluorescencia de tubulina y distribución de los cromosomas en la placa metafásica con tinción de Hoechst 33342 (Molecular Probes). Los resultados fueron comparados con los valores obtenidos en ovocitos MI madurados in vitro durante 6h. Por cada parámetro se observaron entre 3 y 7 ovocitos MII madurados in vivo y entre 10-20 ovocitos cultivados in vitro.

RESULTADOS

Se analizaron 80 MI cultivados in vitro, de los cuales maduraron 50 (62,5%). En comparación con los MII madurados in vivo, los madurados in vitro presentan un eje del huso meiótico ligeramente mayor (14.63mm vs 12.77mm, $p>0.05$) y una menor polarización del citoesqueleto subcortical de actina. Así mismo, mientras que los MII madurados in vivo muestran un potencial de membrana similar (Dym 0,91-1.2), los ovocitos MI cultivados in vitro exhiben una gran variabilidad en la actividad mitocondrial (Dym 0.21-2,86). Por otro lado, la maduración in vitro parece no afectar la disposición de los gránulos corticales, cuyos niveles de fluorescencia no varían entre ovocitos madurados in vivo y cultivados in vitro. Tampoco el número y distribución de los clústeres de retículo endoplasmático parece verse afectados por el cultivo in vitro. El número de clústeres es similar entre ovocitos de la misma cohorte, sugiriendo que la maduración del retículo sería independiente del cultivo e intrínseca al propio ovocito.

CONCLUSIONES

A pesar de una correcta maduración nuclear, muchos ovocitos madurados en vitro procedentes de ciclos estimulados presentan desviaciones de los parámetros citoplasmáticos que comprenden tanto orgánulos como compartimientos citoesqueléticos. Destaca especialmente una mayor variabilidad en el potencial de membrana de las mitocondrias, posiblemente relacionada con la menor competencia al desarrollo de estos ovocitos. Nuestros resultados indican que los ovocitos inmaduros tras estimulación ovárica presentan deviaciones en algunos de los parámetros subcelulares, posiblemente relacionados con la menor competencia al desarrollo de los mismos.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-10: ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES ANIDADOS EN UNA COHORTE DE GESTACIONES CLÍNICAS CONSEGUIDAS MEDIANTE TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA: EVALUACIÓN DE SALUD DE 440 NIÑOS AL AÑO Y 3 AÑOS DE EDAD

MJ Sánchez Soler (1), V López González (2), MJ Ballesta Martínez (2), M Nicolás Arnao (3), J Sánchez (4), M Pérez Izquierdo (5), L Sarabia Cos (6), E Gómez Sánchez (7), V Pérez Fernández (8), E Guillén Navarro (9)
(1) Sección de Genética Médica, H. Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, (2) Sección de Genética Médica, Servicio de Pediatría, H. Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, IMIB-Arrixaca-Murcia CIBERER-ISCIII-Madrid, (3) Sección Ginecología. Clínica IVI, Murcia, (4) Laboratorio de FIV y Andrología. Instituto Murciano de Fertilidad (IMFER), (5) Instituto Bernabeu-Centro de Reproducción Asistida, Murcia (IB), (6) Laboratorio de FIV. Centro de Reproducción Asistida Quirónsalud Dexeus, (7) Director Biología de la Reproducción. Tahe Fertilidad, Murcia, (8) Servicio de Estadística, Universidad de Murcia, (9) IMIB-Arrixaca-Murcia CIBERER-ISCIII-Madrid

INTRODUCCIÓN

Entre el 0.8 y el 4% de los recién nacidos (RN) son concebidos gracias al uso de técnicas de reproducción asistida (TRA) en nuestro entorno. Numerosos estudios describen una mayor tasa de patología perinatal (PP), malformaciones congénitas (MC) y defectos de impronta genómica (DIG) en esta población, aunque los resultados son en ocasiones contradictorios.

OBJETIVO

Determinar la frecuencia de PP, MC y DIG en los RN de una cohorte de niños-TRA y compararlo con un grupo control apareado, así como detectar posibles factores asociados.

MATERIAL Y MÉTODO

Evaluación de niños concebidos gracias a TRA (FIV/ICSI) al año y 3 años de edad, nacidos de una cohorte de mujeres tratadas en la Unidad de Reproducción de 05/12-05/14; evaluación simultánea de controles apareados: siguiente RN al caso concebido de forma natural (niño-CN), del mismo grupo de edad materna (<30/31-34/>34), edad gestacional (< 31/32-37/> 37) y mismo tipo de gestación (única/múltiple). Recogida de datos epidemiológicos, perinatales, descripción de MC mayores/menores y DIG. Análisis estadístico de los datos.

RESULTADOS

Durante el periodo de estudio hubo 249 gestaciones clínicas de las que 214 fueron evolutivas (35 abortos, 14%). Hubo 265 RN, de los que fueron evaluados 232 por un genetista clínico al año y tres años de edad (participación 89%). Simultáneamente se evaluaron 208 de los 232 controles apareados (participación 89%). Datos similares en ambos grupos: edad media materna 33 años; 24% gemelaridad; 25% prematuridad (solo 1 caso de prematuridad extrema <30 semanas).

En el grupo de niños-TRA el 21% presentó bajo peso al nacer, el 9% hipercrecimiento prenatal y el 14% precisó ingreso al nacimiento. No hubo ningún fallecimiento. El 6.5% presentó MC mayores, detectándose asociación ($p<0.05$) entre ellas e hipercrecimiento prenatal, con antecedente de síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO). No asociación con edad materna, prematuridad, gemelaridad, tipo de esterilidad, día de transferencia embrionaria, ni tipo de TRA. Hubo un caso de S. Beckwith-Wiedemann (WBW), de madre con SHO; y un caso de S. Klinelfelter (47,XXY). Hasta el 52% presentó MC menores, siendo lo más frecuente las lesiones cutáneas. El 6% presentó algún trastorno del neurodesarrollo (retraso del lenguaje, trastorno del comportamiento o retraso psicomotor) y está en seguimiento. Solo el 60% de las mujeres tomó ácido fólico preconcepcional. Está pendiente el análisis de datos de niños-CN así como el análisis comparativo entre ambos grupos, dichos resultados serán presentados en la reunión.

CONCLUSIONES

Los resultados preliminares del análisis de datos clínicos de los casos muestran una frecuencia mayor a la presente en población general de patología perinatal y MC mayores. La asociación de estas últimas con SHO independientemente de otros posibles factores de confusión, sugiere que este sea el factor determinante. Hubo un SBW lo que apoya la asociación DIG-TRA.

No obstante, las características de la población estudiada (alta tasa de gemelaridad y edad media materna mayor) hacen necesario estudiar a un grupo control para poder afirmar que estos resultados son atribuibles a la TRA y no a posibles factores de confusión

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-11: EFECTO DE LA ADICIÓN DE QUERCETINA EN LOS MEDIOS DE CULTIVO DE FECUNDACIÓN IN VITRO (FIV): DESARROLLO EMBRIONARIO Y EXPRESIÓN DEL FACTOR INDUCIBLE POR HIPOXIA-1 (HIF-1)

N Hernández Rollán, C Tobajas Vega, E Matilla Pinto, J Mijares Gordún, FM Sánchez Margallo, IS Álvarez Miguel, B Mácias García
Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, Cáceres

INTRODUCCIÓN

Los factores inducibles por hipoxia (HIF) son los principales reguladores de la homeostasis del oxígeno en respuesta a condiciones de hipoxia; estos factores están implicados en la vascularización e invasión placentaria, así como la diferenciación del trofoblasto. La quercetina es un flavonoide vegetal con función antioxidante y se ha observado que puede inducir la expresión del factor inducible de hipoxia-1 (HIF-1) en células alveolares en condiciones de normoxia, pero su mecanismo de acción no ha sido determinado aún.

OBJETIVO

Examinar el desarrollo y la expresión de HIF-1 en blastocistos de ratón obtenidos por FIV cultivados bajo condiciones de normoxia, hipoxia y con diferentes concentraciones de quercetina

MATERIAL Y MÉTODO

Ratones hembras de la cepa B6D2 se estimularon hormonalmente para activar el reclutamiento de los folículos y posteriormente desencadenar la ovulación. Se obtuvieron complejos de cumulus-ovocitos maduros, se realizó una FIV, se cultivaron en KSOM y, una vez en estadío de mórula compacta (día 3) se dividieron en 4 grupos experimentales. FIVKSOM: Después de la fecundación, los embriones se cultivaron en KSOM hasta la fase de blastocisto a 37 ºC con una atmósfera del 5% de CO? y 95% de aire (grupo control, n = 66); FIV50µM o FIV10µM,: las mórulas se trasladaron a medio KSOM suplementado con 50 µg/ml o 10 µg/ml de quercetina en una atmósfera del 5% de CO? y 95% de aire durante durante 2 horas, transfiriéndose nuevamente a KSOM hasta la etapa de blastocistos (n=74 y n=73, respectivamente); FIV3%: las mórulas se incubaron en KSOM en una atmósfera con una concentración de O? del 3% y 97% de N2 durante 2 horas y se cultivaron en condiciones control hasta llegar al estadío de blastocisto (n=74). En todos los blastocistos obtenidos se evaluó el desarrollo hasta el estadío de blastocisto, así como la mayor o menor expresión de HIF-1 mediante inmunocitoquímica.

RESULTADOS

Se utilizó chi-cuadrado para comparar grupos, y se consideró estadísticamente significativo un valor de $p<0,05$. Nuestros resultados mostraron que la tasa de desarrollo embrionario fue del 63.6% para FIVKSOM, 58.1% para FIV50µM, 71.2% para FIV10µM, y 67.6% para FIV3% (media en %; $p>0,05$), no mostrando diferencias estadísticas entre los grupos. Los resultados de inmunofluorescencia detectaron un aumento cualitativo en la expresión de la proteína HIF-1 en los embriones tratados con quercetina, detectándose una expresión máxima en la dosis de 10 µM de quercetina.

CONCLUSIONES

La tasa de desarrollo embrionario no se ve afectada por la tensión de oxígeno, ni por el tratamiento con quercetina durante 2 horas. La suplementación de los medios de cultivo con quercetina produce un aumento de la expresión de la proteína HIF-1; este aumento en la expresión HIF-1 que podría favorecer procesos de angiogénesis implicados en la implantación del embrión y será objeto de posteriores estudios.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-12: UNA ÚNICA OBSERVACIÓN EN D5 ES SUFICIENTE PARA EVALUAR LOS EMBRIONES EN UN PROGRAMA DE OVODONACIÓN; RESULTADOS FINALES DE UN ENSAYO CONTROLADO ALEATORIO PROSPECTIVO Y DOBLE CIEGO

J Ten Morro, J Guerrero Villena, A Rodríguez Arnedo, B Moliner Renau, J Llácer Aparicio, R Bernabeu Pérez
Instituto Bernabeu, Alicante

INTRODUCCIÓN

La observación microscópica de embriones fuera de la incubadora se realiza para evaluar su morfología y establecer un proceso de selección. Sin embargo, estas observaciones pueden producir efectos deletéreos debido a cambios de temperatura, pH y osmolaridad de los medios de cultivo, así como un efecto negativo de la luz directa del microscopio. En los últimos años, son cada vez más los centros que han incorporado la tecnología time-lapse para evitar la observación embrionaria fuera de la incubadora. Aunque esta tecnología se desarrolló para mejorar los criterios de selección e incrementar los porcentajes de implantación, hoy en día se emplean como incubadoras "mejoradas". Tampoco se sabe si existe un efecto negativo de los disparos en serie de estos sistemas para la toma de imágenes. Lo cierto es que además se trata de incubadoras muy caras comparado con las convencionales de sobremesa.

OBJETIVO

Comparar si una única observación embrionaria en día 5 de desarrollo, previa a la transferencia embrionaria, mejora los resultados de laboratorio y clínicos comparados con las observaciones convencionales realizadas en los días 2, 3 y 5 en el programa de ovodonación.

MATERIAL Y MÉTODO:

Ensayo prospectivo controlado aleatorio, doble ciego (pacientes y clínicos), aprobado por el Comité Ético, llevado a cabo desde febrero de 2014 hasta junio de 2016. Un total de 143 parejas realizaron un primer tratamiento de FIV con ovodonación. Tras cumplir con los criterios de inclusión (cavidad uterina normal y grosor endometrial ≥7mm) y exclusión (fallo recurrente de implantación y/o aborto de repetición), las parejas firmaron un consentimiento informado y fueron asignadas al azar a un grupo control (observaciones convencionales en días 2, 3 y 5, n=72) o estudio (única observación en día 5, n=71). Después de comprobar la fecundación, los cigotos se cultivaron en medio Global (LifeGlobal, Canadá) en incubadoras de sobremesa (Planer, Origio o Minc, Cook Medical) hasta el día 5º, donde se evaluaron y seleccionaron para la transferencia según criterios de Gardner y Schoolcraft. Se evaluaron las tasas de fecundación, de formación de blastocistos (respecto a los ovocitos fecundados), el número de embriones útiles (transferidos y criopreservados) y los resultados clínicos, teniendo como objetivo primario la tasa de niño nacido vivo.

RESULTADOS

El número de ovocitos donados fue similar (11,4 ± 2,3 grupo control y 11,2 ± 2,1 grupo de estudio). No hubo diferencias significativas en la tasa de fecundación en el grupo control (77,2%) comparado con el grupo de estudio (73,70%), p = 0,2. En cuanto a la tasa de formación de blastocistos, los resultados también fueron similares entre los dos grupos (57,1% vs 59,4% en los grupos control y estudio, respectivamente, p = 0,5). El número de embriones útiles fue ligeramente superior en el grupo de estudio respecto al control, aunque sin significación estadística (4,6 vs 4,1, p=0,1). Tampoco hubo diferencias en el número de embriones transferidos (1,5 ± 0,5 grupo control vs 1,4 ± 0,5 grupo de estudio, p = 0,1).

Respecto a los resultados clínicos, las tasas de implantación evolutiva tampoco difirieron entre los grupos (47,3% grupo control vs 53,5% grupo de estudio, p=0,3). Por último, y respecto al objetivo primario, la tasa de niño nacido vivo tampoco fue diferente, situándose en el 47,3% en el grupo control y en el 49,3% en el grupo de estudio (p = 0,5).

CONCLUSIONES

Una única evaluación de embriones en el día 5º antes de la transferencia o congelación presenta los mismos resultados clínicos que cuando se observan en día 2, 3 y 5. Esto reduce el coste de los tratamientos, evita manipulaciones innecesarias y potencialmente lesivas y cuestiona el valor predictivo de los parámetros morfológicos y cinéticos embrionarios tempranos.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-13: PRELIMINARY RESULTS ON EXPLORING THE IN VITRO OUTCOME OF UNIPRONUCLEAR EMBRYOS

N Grau Grau (1), N Soler Balaguer (1), C Climent Grau (1), L Escrich Albelda (1), D Beltrán Torregrosa (1), A Tejera Pastor (1), P Buendía Segura (1), R Tena Ros (2), X Vendrell Montón (2), MJ Escribá Pérez (1)
(1) IVI-Valencia, Valencia, (2) Sistemas Genómicos, Paterna, Valencia

INTRODUCTION

Unipronuclear human embryos (1PN) represents 2-7% of microinjected oocytes. Prior works suggested that 1PN could be diploid or haploid, a condition that might be identified by morphometrics; however, it has never been demonstrated. Other authors reported that tripronucleated embryos showed different morphokinetics, according to ploidy; but it has never been described for 1PN.

OBJECTIVES

To describe the 1PN population from a morphometric and morphokinetic point of view, according to their ploidy.

MATERIAL AND METHODS

A total of 90 1PN-zygotes, identified at fertilization assessment, were included in this study. On them, pronucleus (PN) and zygote (ZY) diameters were sized as direct morphometric variables which led us to calculate the pronucleus and zygote volume and the ratios of: PN/ZY diameter and volume, as indirect morphometric variables.

Immediately after sizing, seven zone-free 1PN-zygotes were fixed for ploidy determinations by FISH, using 5-chromosome probes. The remaining 83 zygotes were cultured in a time lapse incubator for 5 or 6 days until the blastocyst stage in order to assess the direct variables: timing for PN appearance (tPNA) and fading (tPNF), cleavage to the 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-cell stages, morula and blastocysts (t2,t3,t4,t5,t6,t7,t8,tM, tB, respectively) which led us to calculate the indirect variables: duration of the first cycle S-phase (PNF-PNA), duration of the second and third cell cycles (t4-t2 and t8-t5, respectively).

On nine 1PN-blastocysts, ploidy was determined by FISH as indicated above.

Concerning in vitro outcome of 1PN-zygotes, we assessed: percentage of embryos that cleaved, progressed to the 4-cell, 8-cell and blastocyst stages. Once the ploidy of 1PN-zygotes and blastocysts were known, morphometrics were compared by test-t. Similarly, once the in vitro outcome and blastocysts ploidy were known, morphometrics and morphokinetics of the 1PN-embryos were compared.

RESULTS

1PN-zygotes were able to cleaved (90.4%), progressed to the 4-cell, 8-cell and blastocyst stages (77.1%, 65.1% and 27.7%, respectively).

FISH results, showed that 57.1% of 1PN-zygotes were haploid (all 23,X0) and 42.9% diploid (two 46,XY and one

PRELIMINARY RESULTS ON EXPLORING THE IN VITRO OUTCOME OF UNIPRONUCLEAR EMBRYOS

Table 1	Haploid 1PN-zygote (n=5)	Diploid 1PN-zygote (n=11)	Average	p-value
Pronucleus diameter (µm)	26.7±1.6	27.4±3.2	27.2±2.8	0.6
Zygote diameter (µm)	103.6±3.3*	109.2±4.1*	N.A	0.02
Ratio PN/ZY diameter	0.3±0.01	0.2±0.03	0.25±0.03	0.7
Pronucleus volume (µm3)	10074.1±1762.3	11243.3±4490.1	10878.0±3818.6	0.6
Zygote volume (µm3)	584831.6±56930.7*	686225.9±75344.1*	N.A	0.02
Ratio PN/ZY volume	0.02±0.003	0.02±0.007	0.017±0.006	0.8

Table 2	Progress to blastocyst (n=23)	Not progress to blastocyst (n=60)	Average	p-value
Timing of (h):				
tPNA	7.5±2.4	7.9±2.9	7.8 ± 2.7	0.6
tPNF	22.7±3.5*	26.9±10.6*	N/A	0.008
t2	26.3±3.4	27.2±5.8 (n=43)	26.9 ± 5.1	0.5
t3	35.8±7.4	35.5±8.0 (n=35)	35.6 ± 7.7	09
t4	39.2±6.6	39.5±10.3 (n=38)	39.4 ± 9.02	0.9
t5	50.0±8.3	46.9±12.6 (n=33)	48.1± 11.2	0.3
t6	52.3±9.4	52.8±16.9 (n=33)	52.6 ± 14.2	0.9
t7	61.3±12.9	58.4±17.8 (n=32)	59.5 ± 15.9	0.5
t8	62.6±13.7	62.4±18.5 (n=24)	62.5 ± 16.2	0.9
tmorula	95.8±9.0	94.2±17.3 (n=6)	95.4 ± 11.0	0.8
tblastocyst	113.4±11.3	-	-	-
1st S-phase	15.0±3.4*	19.1±10.0* (n=60)	N/A	0.007
Cc2	12.8±5.1	12.8±8.5 (n=31)	12.8 ± 7.3	1.0
Cc3	22.1±7.6	26.1±16.3 (n=21)	24.1 ± 12.7	0.3

46,XX). As to blastocysts, 88.9% were diploid (five 46,XX and three 46,XY) whereas the remaining blastocyst was a female haploid.

Morphometrics of 16 unipronuclear zygotes were compared, according to ploidy. Although there were no significant differences in most of the morphometric variables assessed, the zygote diameter and volume were significantly larger in those diploid 1PN-zygotes (109.2±4.1µm and 686225.9±75344.1µm3) than in haploid ones (103.6±3.3µm and 584831.6±56930.7µm3).

Since only one haploid blastocyst was observed, comparison of the morphometrics and morphokinetics according to the blastocyst ploidy was not applied.

Comparison of the morphometrics and morphokinetics of the 1PN-embryos, according to the ability to progress to the blastocyst stage showed that most of the morphokinetics and all the morphometrics assessed were comparable, exception made for the tPNF and the related S-phase duration. Indeed, 1PN-embryos that had progressed to blastocysts, pronucleus faded earlier than in those that had not (22.7±3.5h vs. 26.9±10.6h) and, in consequence, the S-phase was shorter in duration (15.0±3.4h vs.19.1±10.0h, respectively).

CONCLUSIONS

The 1PN-zygote population is heterogeneous in terms of ploidy, as there are haploid and diploid zygotes. However, the 1PN-blastocyst population is mostly formed by diploid embryos. On the other hand, whereas morphometrics could provide information about the ploidy of 1PN-embryos at the 1-cell stage, the 1st cycle S-phase duration could inform about the 1PN-embryo ability to develop to blastocysts, and therefore, to finally get a diploid blastocyst.

Nevertheless, more data to confirm and assess the predictable value of these preliminary observations are required. Furthermore, complementary genetic analysis on euploidy and heteroparentality are also required as well.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-14: PRIMEROS EMBARAZOS Y NACIMIENTOS TRAS EL CULTIVO EMBRIONARIO EN TEMPERATURA FISIOLÓGICA VARIABLE

I Cuevas Saiz, S Arrones Olmo, I Martínez Rodero, A Genovés Pérez, C Olmedo Illueca, S Royo Bolea, L Abad de Velasco, A Morales Vicente, M Barea Gómez.
Hospital General Universitario de Valencia

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han introducido multitud de cambios en las condiciones de cultivo embrionario, dirigidos a simular las condiciones del útero y mejorar las tasas de embarazo. No obstante, la temperatura establecida para el cultivo embrionario es de 37ºC desde los inicios de la reproducción asistida, pese a diferir de las condiciones in vivo. Se ha demostrado que el cuerpo humano experimenta variaciones cíclicas de temperatura de entre 0,8ºC y 1ºC a lo largo del día. Estas variaciones parecen ser consecuencia del reloj circadiano central localizado en el núcleo supraquiasmático hipotalámico.

OBJETIVO

Comparar el cultivo embrionario a temperatura constante de 37ºC frente al cultivo a temperatura variable a lo largo del día, simulando condiciones fisiológicas.

MATERIAL Y MÉTODO

En una de las 6 cámaras del incubador MIRI-TL? se programó un algoritmo para modificar la temperatura de manera cíclica a lo largo del día, oscilando de 36.2ºC a 37.2ºC. Inicialmente, sólo se cultivaron embriones tripronucleares. Cuando se observó que alcanzaban el estadio de blastocisto, la comisión de ética e investigación concedió su autorización para el cultivo de embriones humanos en esta cámara. El cultivo de embriones en condiciones de temperatura variable (CTV) se inició en enero de 2016 y continúa realizándose actualmente.

Se analizaron retrospectivamente 40 embriones cultivados en CTV (eCTV) de 17 pacientes. De éstos, 17 se transfirieron en fresco y 23 se vitrificaron en estadio de blastocisto. El grupo control fueron 215 embriones de implantación conocida (KID), cultivados a temperatura constante (37ºC). De todos los embriones, eCTV y control, se analizaron los datos morfocinéticos.

Los datos se analizaron con el paquete estadístico SPSS 15.0 utilizando un test T-Student.

RESULTADOS

De los 17 eCTV transferidos, 9 no implantaron (KID-), 4 implantaron (KID+) y los otros 4 resultaron en implantación no informativa, ya que dieron lugar a una gestación de 1 saco tras la transferencia de 2 embriones. De los 23 blastocistos eCTV vitrificados, 10 continúan vitrificados y 13 fueron transferidos, resultando en 2 KID-, 1 KID+ y 10 positivos no informativos.

De los eCTV con implantación positiva, uno resultó en un recién nacido vivo tras 38 semanas de gestación. El resto son gestaciones en curso.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) en la tasa de implantación entre los eCTV y el grupo control (31% vs 26% respectivamente).

Al comparar el perfil morfocinético de los eCTV y el grupo control se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) en t2, t3, t4, t6 y t7 de ambos grupos, siendo los tiempos de división de los eCTV superiores a los de los controles.

En cuanto al análisis de los perfiles morfocinéticos de embriones que resultaron en KID+, al comparar eCTV y controles, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) en t5, siendo inferior para los eCTV.

Así mismo, los tiempos de división de los embriones KID-, contrastando eCTV con controles, también mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) en t3, t4, t6 y t7, siendo inferiores para eCTV.

CONCLUSIONES

Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de implantación entre los embriones cultivados a 37ºC y los eCTV, el comportamiento morfocinético de ambos grupos es diferente. Excepto para t5, los eCTV cultivados a temperaturas más fisiológicas presentaron tiempos de división más tardíos. Este hecho ha sido relacionado con un mayor potencial de desarrollo en algunas publicaciones.

Se reporta el primer nacimiento de un bebé normal a partir del cultivo embrionario en CTV. No obstante, es necesario aumentar el número de pacientes en el estudio para confirmar que reproducir las variaciones térmicas del cuerpo humano podría mejorar el desarrollo embrionario in vitro.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-15: CLEAVAGE ORIENTATION IN THE EARLY HUMAN EMBRYO: CONSIDERING THE PERIVITELLINE SPACE AND THE ZONA PELLUCIDA (ZP)

A Martin Bastida, L Kellam, J Graves, A Campbell, S Fishel
CARE Fertility, Nottingham, Nottinghamshire, Reino Unido.

INTRODUCTION

The ZP protects the oocyte and the embryo in the earliest stages of development and retains the developing blastomeres in a confined area. It facilitates fertilization and prevents polyspermia through the cortical reaction. It plays a role in the organization and differentiation of granulosa cells during folliculogenesis and is associated with specialised trans-zonal projections as part of the oocyte-cumulus complex.

The first meridional division of the mammalian zygote is directed by the mitotic spindle position, yet the location of the polar bodies as a visual indicator of the cleavage plane is unreliable.

In this observational study of the perivitelline space (PVS) of oocytes at ICSI, and the first cleavage furrow of zygotes, an area of the cytoplasmic membrane (CM) in close contact with the ZP has been observed in >99% of oocytes. The first cleavage furrow occurred in association with this area suggesting a visible marker of the site of the first cleavage plane.

OBJECTIVES

- To prospectively examine metaphase II oocytes at ICSI to determine the presence and incidence of a contact area between the CM and the ZP in the PVS.

- To retrospectively annotate time-lapse videos of developing zygotes showing a clear CM-ZP contact area, with respect to the site of the first cleavage furrow.

MATERIAL AND METHODS

Prospective analysis

116 metaphase II oocytes from 13 unselected IVF cycles were analysed at ICSI. Oocytes were fully rotated whilst

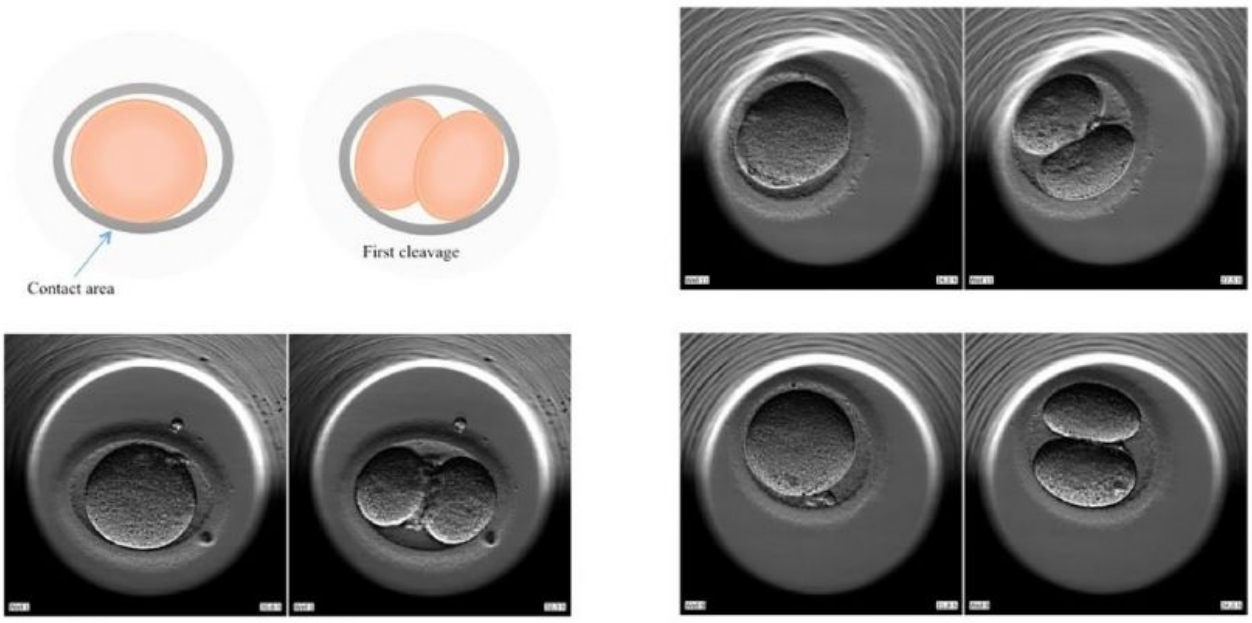


Figure 1. CM-ZP contact area and first-cell division. Time-lapse images of human zygotes initiating first cleavage from the contact area.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

using inverted microscopy to check the PVS for the presence of a CM-ZP contact area. Mean age was 34.76 years (+/- 4.88 sd).

Retrospective analysis

428 embryos from 90 ICSI cycles (5/11/2016-12/4/2017) with at least one pronucleus and showing the presence of a clear CM-ZP contact area were analysed from PN formation to 2-cell stage for the location of the first cleavage furrow and cell division. Mean age was 37.28 years (+/- 5.18 sd).

RESULTS

Incidence of a CM-ZP contact area

Of the 117 oocytes analysed at ICSI, a contact area was observed in 99.14% (115/116). Only one oocyte (0.86%) did not exhibit a contact area.

CM-ZP contact area and first-cleavage axis position

In 61.68% (264/428) of embryos, the position of the cleavage furrow was at the CM-ZP contact point (Figure 1). This association was not seen in 9.11% (39/428) of the embryos, and 29.21% (125/428) were inconclusive due to hindered visibility.

77% of the vitrified embryos established their first cleavage axis from the contact point, whereas only 54.94% of discarded embryos had.

CONCLUSIONS

This is a novel observation reporting the existence of an area of close contact, with no PVS, between the CM and ZP in >99% of metaphase II oocytes. With >61% of zygotes initiating the first cleavage furrow at this specific area, we suggest this contact area may serve as a visible indicator of the first cleavage axis. Also, as significantly more good quality blastocysts developed from zygotes cleaving at the CM-ZP area, this observation may be used in selection criteria in IVF treatments. This is a new insight into the PVS and may suggest a possible role of CM-ZP contact in the establishment of polarity and embryo cleavage mechanics.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-16: EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE EL ESTADO OXIDATIVO DEL LÍQUIDO FOLICULAR Y SU EFECTO EN LOS TRATAMIENTOS DE FERTILIDAD

A Ortiz Ruiz (1), G Lozano Cordero (1), M Macedo Morales (1), M Márquez Pérez (1), F Monllor Nácher (1), C Rodríguez Moratino (1), J Espino Palma (2), I Bejarano Hernado (2)
(1) Centro Extremeño de Reproducción Humana Asistida, Badajoz, (2) Universidad Extremadura

INTRODUCCIÓN

La melatonina y sus metabolitos protegen del daño oxidativo tanto de forma directa, secuestrando especies reactivas, como indirecta, estimulando el sistema enzimático antioxidante. En particular, actúa neutralizando radicales en procesos como la gametogénesis, fecundación, desarrollo fetal y parto. Además se ha descrito su secreción en ovario y placenta.

OBJETIVO

Estudiar la relación entre el estado oxidativo de pacientes sometidos a técnicas de reproducción asistida y el efecto de la administración de melatonina sobre la calidad ovocitaria y embriones y por tanto sobre el éxito de las TRA.

MATERIAL Y MÉTODO

Establecimos 4 grupos de observacionales en una población de mujeres en tratamiento de FIV (n=40, 30-40 años):

Grupo 1: No tratadas*

Grupo 2: No tratadas**

Grupo 3: 3 mg melatonina

Grupo 4: 6 mg melatonina

*1ª FIV de parejas con factor masculino puro (mujeres "fértiles")

** 2ª ó 3ª FIV de parejas que fracasaron con la FIV 1 (mujeres infértiles)

La administración de melatonina se llevó a cabo durante los 45 días previos a la punción folicular (PF). El día de la punción se recogió la primera orina de la mañana en todos los grupos para cuantificar niveles de 6-sulfatoximelatonina (6-SMT) como indicador de niveles sistémicos de melatonina.

En el líquido folicular (LF) se cuantificaron los niveles de antioxidantes totales (TAC), superóxidodismutasa (SOD), y 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8HdG) como marcador de estrés oxidativo en el ADN para analizar y comparar el estado oxidativo en cada grupo. Estos parámetros también se utilizaron para estudiar los efectos del tratamiento con melatonina en mujeres infértiles. Se correlacionó los marcadores de estrés oxidativo y los parámetros antioxidantes del líquido folicular con la calidad de los ovocitos y los resultados de las TRA. La espectrofotometría se monitorizó mediante el lector de placas multiwell (TECAN infinite M200).El análisis estadístico y la representación se llevaron a cabo con el software GraphPad Prism 5.0. Los datos se expresaron como las medias ± S.E.M. El análisis de la varianza de una vía seguido de test de Tukey. La diferencia se consideró significativa para un valor de $P<0,05$.

RESULTADOS

El grupo1 mostró valores significativamente superiores del metabolito urinario 6-SMT en las pacientes con respecto al grupo 2. Los niveles de de 6-SMT aumentaron de manera significativa ($p<0,05$) con la administración de 3 o 6 mg de melatonina.

Se obtuvieron niveles de melatonina en LF se vieron incrementados ($p<0,05$) en mujeres con tratadas con melatonina exógena con respecto a mujeres infértiles no tratadas. Dicho aumento se observó de forma paralela en la TAC de estas pacientes ($p<0,05$).

Sólo 6 mg de melatonina indujeron aumento significativo ($p<0,05$) en la actividad SOD en el LF de las pacientes infértiles, incluso superiores a los niveles de la población fértil ($p<0,05$).

Del mismo modo, se observó una disminución dosis dependiente del daño en el ADN de los grupos tratados (grupos 3 y 4 $p<0,05$) con respecto al grupo de pacientes infértiles no tratadas.

CONCLUSIONES

Niveles menores de melatonina sistémica están asociados a la infertilidad.

La administración exógena de melatonina contribuye al aumento de sus niveles en LF y aumenta de forma significativa la capacidad antioxidante de las pacientes.

La melatonina revierte el estado oxidativo del LF de infértiles, siendo éste más similar a aquel encontrado en muestras de fértiles.

La administración de melatonina previa a la PF induce un aumento de ovocitos totales recuperados, porcentaje de ovocitos maduros, porcentaje de zigotos y número de embriones, contribuyendo de forma indirecta con el aumento de la tasa de embarazo.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-17: LA TRANSFERENCIA DE HUSO MEIÓTICO MEJORA EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE OVOCITOS CON POTENCIAL LIMITADO: PRUEBA DE CONCEPTO EN EL MODELO MURINO

E Mestres Gonzalvo (1), R Balmaseda Casabó (2), I Miguel Escalada (3), M Garcia Jiménez (1), I Vanrell Barbat (1), J González Jiménez (2), J Palacios Sánchez (2), G Calderón de Oya (1), N Costa Borges (1)
(1) Embryotools, R&D Center, Barcelona, (2) PCB-PRBB. Animal Facility Alliance, Barcelona, (3) IDIBAPS. Genomic-programming laboratory, Barcelona

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se han propuesto varias estrategias para evitar la herencia de mutaciones en el ADN mitocondrial, basadas en el reemplazo mitocondrial en estadios tempranos del desarrollo. La transferencia de huso meiótico (meiotic spindle transfer, MST) consiste en transferir el ADN genómico de ovocitos afectados (estructurado en forma de huso meiótico en ovocitos MII) a ovocitos sanos de donantes que han sido previamente enucleados. Debido a que esta técnica implica la sustitución de la mayoría del contenido citoplasmático del ovocito afectado, se ha postulado que su utilidad podría extenderse no solo a la eliminación de mutaciones mitocondriales, sino también a casos de infertilidad causada por deficiencias citoplasmáticas en el ovocito.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio es evaluar el potencial de la MST para mejorar el desarrollo embrionario de ovocitos de ratón con capacidad de desarrollo limitada.

MATERIAL Y MÉTODO

Se obtuvieron ovocitos en MII de dos cepas de ratón con haplotipos mitocondriales divergentes: la cepa hibrida B6CBAF1 y la New Zealand Black (NZB). Los husos meióticos de ovocitos NZB se transfirieron a ovocitos B6CBAF1 previamente enucleados. Tras la MST, los ovocitos reconstruidos se inseminaron mediante ICSI, junto a ovocitos control no manipulados de ambas cepas. Se evaluó el desarrollo embrionario in vitro hasta el estado de blastocisto. Los blastocistos obtenidos se vitrificaron y fueron transferidos posteriormente a hembras receptoras para estudiar su desarrollo a término. Las crías nacidas se estabularon hasta la madurez y se cruzaron con animales wild-type para evaluar su estado general de salud, comportamiento y fertilidad.

Todos los procedimientos con animales se realizaron según protocolos aprobados por el comité ético de investigación animal del Parque Científico de Barcelona. Los ovocitos se obtuvieron de hembras superovuladas de entre 6-10 semanas de edad. La MST se realizó en medio de manipulación suplementado con citocalasina B (5µg/ml). Tras la enucleación, los carioplastos se expusieron a una solución suplementada con Sendai virus inactivado para promover la fusión de membranas. La fusión entre el carioplasto y citoplasto se evaluó 2h después, tras lo cual se realizó ICSI con espermatozoides de machos B6CBAF1 con el actuador Piezo-Drill. Las transferencias de blastocistos se realizaron con un método no quirúrgico.

RESULTADOS

Se obtuvieron altas tasas de fusión entre carioplasto y citoplasto (98%) tras efectuar la MST. Las tasas de supervivencia durante la ICSI fueron similares entre el grupo MST y los controles B6CBAF1 y NZB (97.0%, 95.4% y 98.0%, respectivamente; p=0.368). La tasa de formación de blastocitos con ovocitos control NZB (n=106) fue muy baja (5%), y significativamente inferior a la obtenida con ovocitos control B6CBAF1 (n=86) (72%; p<0.0001). Después de transferir husos NZB a ovocitos B6CBAF1 previamente enucleados, se inseminaron mediante ICSI (n=146). La tasa de formación de blastocistos incrementó hasta un 35% (p<0.0001), sugiriendo que el contenido citoplasmático B6CBAF1 es capaz de mejorar el pobre desarrollo embrionario inherente de la cepa NZB. Un total de 10 de los 46 (21.7%) blastocistos transferidos del grupo MST y 15 de los 56 (26.7%) blastocistos transferidos del grupo control B6CBAF1 se desarrollaron a término. Las crías nacidas tras MST se estabularon hasta edad adulta y se cruzaron hasta generación F2, demostrando ser fértiles y con salud y comportamientos similares al de las crías control.

CONCLUSIONES

Estos resultados indican que la MST puede ser aplicada con éxito para evitar el arresto embrionario en ovocitos de ratón de calidad o potencial limitados. La técnica MST no afecta al desarrollo embrionario in vitro y las crías obtenidas tienen salud y comportamientos comparables al control.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-18: IMPORTANCIA DEL MEDIO DE CULTIVO EN EL TIMING EMBRIONARIO: MEDIOS SECUENCIALES VS MEDIO ÚNICO

P Muñoz Soriano, V Antequera Durán, E Ferrer Robles, C Calatayud Lliso, M Ruiz Jorro
CREA, Valencia

INTRODUCCIÓN

Para poder clasificar correctamente los embriones en el laboratorio de FIV, ASEBIR publicó en su Cuaderno de Embriología Clínica unos intervalos de tiempo en los que se debe observar los embriones para anotar sus características. Eventos como la presencia y número de pronúcleos son de vital importancia para la valoración y selección de los embriones en cultivo.

Por otra parte, se ha observado que el medio de cultivo empleado puede modificar el ritmo de división embrionaria y con ello, el intervalo de tiempo idóneo para poder analizar el embrión. Conocer estos intervalos más idóneos, dependiendo del medio de cultivo utilizado, es fundamental para la rutina diaria de un laboratorio de embriología.

En nuestro caso, a raíz de la introducción del sistema de cultivo time-lapse y con él, la utilización de un medio de cultivo único (G-TL – Vitrolife – Suecia) y habiendo confirmado previamente su eficacia comparable a los medios de cultivo secuenciales de la misma marca (G1 PLUS + CCM – Vitrolife – Suecia), valoramos la opción de utilizar el G-TL también en los casos donde no se realizaba cultivo time-lapse, pero para ello era imprescindible conocer si este cambio ocasionada una diferencia en el timing de eventos embrionarios y especialmente el tiempo de desaparición de pronúcleos, ya que es un factor fundamental que puede llevar a descartar un embrión de forma errónea.

OBJETIVO

Analizar las posibles diferencias en tiempos de división embrionaria y de desaparición de pronúcleos entre los medios secuenciales G1-PLUS + CCM y el medio único G-TL.

MATERIAL Y MÉTODO

Se analizaron los datos de time lapse de ciclos de FIV/ICSI en 21 mujeres menores de 40 años que fueron distribuidas, de forma prospectiva y aleatoria, en uno u otro grupo (no se pudieron incluir más pacientes al interrumpirse el suministro comercial de CCM durante el estudio). El número inicial de embriones fue de 47 en G-TL y 56 en secuenciales.

El cultivo se realizó en condiciones de hipoxia con oxígeno al 5% en un incubador Bench-Top con sistema Time-Lapse (GERI - Genea BIOMEDX).

Las variables analizadas fueron: borrado de pronúcleos (PNf), t2, t3, t4, t5, t8, tM (tiempo de mórula), tSB (tiempo de inicio de cavidad), CC2, S2, CC3 y S3.

RESULTADOS

En los datos analizados, se observan diferencias estadísticamente significativas en los eventos: PNf, t3, t8, tSB, tEB y CC2. En todos los casos, la velocidad de división en el medio de cultivo G-TL fue más rápida que en los medios secuenciales G1-PLUS + CCM.

CONCLUSIONES

El uso de diferentes tipos de medio de cultivo puede afectar la velocidad de división de los embriones y ello puede influir en la valoración que hacemos de los mismos.

En caso de cultivo sin time-lapse, una reducción en el tiempo de borrado de pronúcleos puede ocasionar que se desechen cigotos viables si no se tiene en cuenta este hecho.

En caso de cultivo time-lapse, el medio de cultivo puede afectar a los posibles algoritmos desarrollados para la selección embrionaria.

Ante un cambio en las condiciones de cultivo, el laboratorio de embriología debe valorar si éste afecta a la dinámica embrionaria, ya que esto puede afectar a sus resultados.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

	G-TL	G1 PLUS + CCM	G1 PLUS + CCM
PNf	22	25	25
t2	27,7	29,8	29,8
t3	34,9	39,6	39,6
t4	39,7	41,6	41,6
t5	47,8	51	51
t8	58	63,7	63,7
tM	86,2	101,8	101,8
tSB	97,3	111,9	111,9
tEB	110,8	118,4	118,4
CC2	7,8	9,8	9,8
S2	5	3,8	3,8
CC3	4,9	12,6	12,6
S3	12,2	13,8	13,8

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-19: CALIDAD OVOCITARIA: MADURACIÓN IN VITRO ¿ANTES O DESPUÉS DE LA VITRIFICACIÓN?

Y Segovia Huertas (1), N Victory (1), I Peinado (2), LM Garcia-Valverde (3), M Garcia (1), J Aizpurua (4), A Monzó (2), MJ Gómez-Torres (5)
(1) Departamento de Biotecnología, Universidad de Alicante, Alicante, España, (2) Unidad de Reproducción Humana, Hospital La Fe, Valencia, Spain, (3) IVF Spain, Reproductve Medicine, Alicante, España, (4) IVF Spain, Reproductve Medicine, Alicante, España; Cátedra Human Fertility, Universidad de Alicante, Alicante, España, (5) Departamento de Biotecnología, Universidad de Alicante; Cátedra Human Fertility, Universidad de Alicante, Alicante, España

INTRODUCCIÓN

La combinación de la maduración in vitro (IVM) y la criopreservación de ovocitos inmaduros (PI) se puede convertir en un proceso novedoso en el campo de la Reproducción Asistida, principalmente en aquellos casos en que las mujeres no puedan ser sometidas a ciclos de estimulación hormonales que permitan la obtención de ovocitos maduros (MII). La combinación de ambas técnicas evitaría el síndrome de hiperestimulación ovárica. Por otra parte, sería un programa especialmente útil y atractivo en casos oncológicos, ya que al no ser necesaria la estimulación hormonal se podría empezar el tratamiento de inmediato, con la previa extracción de ovocitos PI. En la práctica clínica, se considera que un ovocito es apto para fecundar cuando se ha producido la extrusión del primer corpúsculo polar y cuando no se observa ninguna alteración citoplasmática importante a nivel de microscopía óptica (MO). Diversos estudios han establecido que, a nivel ultraestructural, los orgánulos citoplasmáticos varían de forma considerable durante el proceso de maduración ovocitaria. Además es importante tener en cuenta que los procesos de vitrificación/desvitrificación pueden causar alteraciones a nivel citoplasmático.

OBJETIVO

El objetivo de nuestro estudio es analizar la maduración citoplasmática, a partir de las características ultraestructurales, de ovocitos PI humanos madurados in vitro antes o después de la vitrificación, para conocer qué procedimientos y orden de aplicación son más eficaces en Técnicas de Reproducción Asistida.

MATERIAL Y MÉTODO

En este estudio se evaluó la calidad de 22 ovocitos humanos en fase MII, 10 ovocitos fueron vitrificados y después madurados in vitro (Grupo 1), mientras que los 12 restantes fueron madurados y después vitrificados (Grupo 2). Todos los ovocitos fueron fijados y procesados para microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se analizaron diversas características morfológicas como el tamaño del ovocito, la zona pelúcida (ZP) y el espacio perivitelino, así como el número de mitocondrias, agregados mitocondria-retículo endoplasmático (M-SER) y complejos mitocondria-vesícula (M-V), número de gránulos corticales (GC) y microvellosidades, y el grado de vacuolización citoplasmática.

RESULTADOS

Todos los ovocitos observados con MO presentaron una forma redondeada, con un diámetro que oscilaba entre 90-105 µm, con poca granulosidad citoplasmática y con una ZP continua. Cuando analizamos las imágenes a nivel ultraestructural mediante TEM, pudimos observar que en ambos grupos, los orgánulos estaban adecuada y uniformemente distribuidos, formando un ooplasma homogéneo. Las mitocondrias fueron los orgánulos más numerosos y con frecuencia aparecieron tanto aisladas como asociadas a retículo endoplasmático (M-SER) y a vesículas (M-V). La proporción de estas dos asociaciones es un factor clave a la hora de determinar el grado de madurez citoplasmática, siendo lo normal encontrar una proporción mayor de M-SER en relación a M-V. En nuestro estudio la proporción de M-V fue mayor que la de M-SER. La presencia de muchos complejos M-V podría estar asociada con una sobremaduración citoplasmática. En algunos ovocitos del grupo 2 encontramos GC dispersos por el ooplasma y la presencia de aparato de Golgi, lo que nos indica cierto grado de inmadurez citoplasmática. No se encontraron diferencias significativas entre el número de microvellosidades ni en el grado de vacuolización.

CONCLUSIONES

El hecho de vitrificar antes o después de la maduración in vitro, no implica diferencias significativas entre los grupos estudiados. No obstante, en los ovocitos PI vitrificados después de su maduración (Grupo 2) sí que detectamos una tendencia a la mejora de la calidad ovocitaria, atendiendo a los parámetros analizados. Por lo tanto, se precisa de la continuidad y ampliación del número de muestras para confirmar dichos resultados.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-20: RESULTADOS REPRODUCTIVOS UTILIZANDO UN SISTEMA DE VITRIFICACION DE OVOCITOS CERRADO VERSUS UN SISTEMA ABIERTO

A Pujol Massana, MJ Zamora Berlanga, A Obradors Cherta, D García García, A Rodríguez Aranda, R Vassena
Clínica EUGIN, Barcelona

INTRODUCCIÓN

La vitrificación es un método de congelación ultrarápido que permite la deshidratación de las células evitando la formación de cristales de hielo gracias al uso de altas concentraciones de crioprotector.

Actualmente es el método más usado para la congelación de embriones y su desarrollo ha permitido la congelación de ovocitos con unas tasas de éxito suficientemente altas como para su uso diario en los laboratorios de FIV. Dependiendo del sistema usado para el almacenaje, la vitrificación puede ser en sistema abierto (la muestra entra en contacto con el nitrógeno) o cerrado (la muestra queda sellada y nunca entra en contacto con el nitrógeno). La técnica más usada y con mejores resultados reportados es la vitrificación abierta. En algunos países la ley prohíbe el uso del sistema abierto y, por tanto, requieren de un buen sistema cerrado para su práctica diaria.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio es comparar prospectivamente un método de vitrificación de ovocitos abierto (Cryotop®, Kitazato) con un método cerrado (Rapid-i®, Vitrolife), en una misma base genética y de estimulación ovárica

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio prospectivo realizado en un mismo centro entre Julio de 2014 y Noviembre de 2016. Se incluyeron los ovocitos de 86 donantes. De cada donante se recuperaron un mínimo de 12 ovocitos maduros (MII); 6 de los ovocitos se vitrificaron con Rapid-i y 6 con Cryotop. Cada grupo de 6 ovocitos fueron asignados a una receptora diferente, entrando en el estudio un total de 172 receptoras. Para cada receptora, se recogieron sus datos demográficos: edad y BMI y datos de la muestra de semen: procedencia (pareja o donante), tipo (fresco o congelado) y diagnóstico. Se compararon los resultados de laboratorio (supervivencia, fecundación, número de embriones transferidos y score morfológico, número de embriones congelados) y los datos reproductivos de la primera transferencia (tasas de embarazo bioquímico, clínico, evolutivo y tasa de niño nacido) entre las dos técnicas mediante t-tests y pruebas Chi2.

RESULTADOS

Las características demográficas de las receptoras fueron similares (edad: 41.2±4.7; IMC: 23.8±4.0). La procedencia del semen fue también similar (80.1% pareja vs. 19.9% donante). La mayoría de las muestras utilizadas fueron congeladas (88.8%) y el diagnóstico mayoritario fue astenozoospermia (64.6%).

La tasa de supervivencia de los ovocitos fue superior usando Rapid-i (93.7% vs. 86.2%, p0.05). La tasa de niño nacido también fue similar entre Rapid-i y Cryotop (38.2% vs. 32.3%, p>0.05).

CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren que ambos sistemas de vitrificación, abierto y cerrado, ofrecen resultados de laboratorio y reproductivos en su mayoría comparables hasta la tasa de niño nacido. Hay que tener en cuenta que las participantes en el estudio fueron donantes de ovocitos, mujeres jóvenes con buena salud reproductiva por lo que se debe ser prudente en extrapolar los resultados obtenidos en otras poblaciones.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-21: PRIMEROS EMBARAZOS CON OVOCITOS CRIOPRESERVADOS CON UN SISTEMA DE VITRIFICACIÓN AUTOMATIZADO

Miquel Solé Inarejos, M Boada Palà, C De la Cruz Rodrigo, E Clua Obrado, A Veiga Lluch, B Coroleu Lletget
Hospital Universitari Dexeus, Barcelona

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se están introduciendo nuevas tecnologías en los laboratorios de Técnicas de Reproducción Asisitida (TRA) con un doble objetivo: mejorar los resultados y estandarizar los procesos reduciendo la variabilidad inter/intra operador.

En el ámbito de la criobiología, el primer equipo automático de vitrificación GAVI™ (Merck®, Alemania) se presentó en 2014. Inicialmente su aplicación se restringía a la vitrificación de embriones. Los ovocitos son más sensibles al proceso de vitrificación que los embriones por lo que se requirió el desarrollo de un protocolo automatizado distinto y no fue hasta octubre 2016 cuando se incorporó la vitrificación de ovocitos.

Los sistemas de vitrificación manuales que se emplean habitualmente permiten obtener excelentes resultados aunque, en ovocitos, se ha evidenciado una gran variabilidad. Un sistema automático de vitrificación debería permitir un mayor control de la temperatura y volúmenes durante el proceso de equilibración, lo que debería traducirse en unos resultados más estables. Además, la utilización de un soporte cerrado, evitaría cualquier riesgo teórico de contaminación.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio es analizar los resultados de los primeros ciclos de vitrificación/desvitrificación de ovocitos humanos mediante un sistema automático para valorar su aplicabilidad en TRA.

MATERIAL Y MÉTODO

Se han incluido 11 ciclos de donación de ovocitos en los que se vitrificaron 138 ovocitos en metafase II (≥8 ovocitos/donante): 70 mediante vitrificación manual y 68 automáticamente. Los ovocitos de cada donante se dividieron en dos grupos (>4 ovocitos) vitrificándose en un grupo de forma manual con Cryotop® (Kitazato, Japón) y en el otro automáticamente con los medios, soporte y equipo GAVI™. Todos los procesos fueron llevados a cabo por el mismo operador a las 38 h + 30' de la administración de hCG.

Una vez realizada la asignación de los ovocitos a la receptora, se procedió a la desvitrificación de todos los ovocitos vitrificados. Los ovocitos se microinyectaron a las 2-3 horas de la desvitrificación. El cultivo embrionario se llevó a cabo con medio GTL® (Vitrolife®) cubierto con aceite Ovoil® (Vitrolife®). La valoración embrionaria se realizó según el sistema de clasificación ASEBIR 2015 seleccionándose para la transferencia los embriones de mejor calidad. La transferencia embrionaria se realizó en D3.

RESULTADOS

Hasta el momento se han realizado 7 ciclos de desvitrificación. Se han desvitrificado un total de 80 ovocitos. En el grupo de ovocitos vitrificados manualmente, se desvitrificaron 38 ovocitos obteniéndose una tasa de supervivencia 76,3%, una tasa de fecundación de 65,5% y tasa de embriones evolutivos 57,9%. Se desvitrificaron también los 42 ovocitos correspondientes a la vitrificación automática obteniéndose unas tasas del 78,6%, 75,8% y 64,0% respectivamente.

La media de embriones transferidos fue 1,57. Se obtuvieron 3 embarazos, dos procedentes de ovocitos vitrificados con el sistema GAVI™ y uno procedente del transfer mixto. Los tres embarazos son únicos y presentan una evolución normal tras más de 20 semanas de gestación.

El tiempo empleado para la vitrificación fue similar en ambos sistemas, siendo de 30+5 minutos para 6 ovocitos.

CONCLUSIONES

Los resultados preliminares obtenidos indican que el sistema GAVI™ para vitrificación de ovocitos es un sistema sencillo que ofrece tasas de supervivencia comparables al sistema manual.

Por otra parte, hasta el momento, se observa una correcta tasa de fecundación y de embriones evolutivos que demuestran la viabilidad de este sistema para TRA.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-22: EFECTO DEL GRADO DE REEXPANSIÓN DE BLASTOCISTOS DESVITRIFICADOS EN LAS TASAS DE EMBARZO

S Novo Bruña, C Castelló Zupac, A Rodríguez Isern, J Massó Hernáez, M Asensio Paños, M López-Teijón
Instituto Marques, Barcelona

INTRODUCCIÓN

La vitrificación permite preservar la viabilidad de los embriones eficientemente. La tendencia de los blastocistos a colapsar durante la vitrificación hace que valorar su supervivencia tras la desvitrificación resulte más compleja que en embriones a estadio de células. Varios estudios relacionan la reexpansión del blastocisto post desvitrificación con su probabilidad de embarazo. No obstante, en estos estudios se evidencian ciertas limitaciones como la inclusión de casos de transferencias de más de un blastocisto (Yin et al., 2016), la rigurosidad en el tiempo de reobservación (Ahlström et al., 2013), o bien que los grados de reexpansión analizados no están definidos con suficiente precisión (Qing-Yun Du et al., 2016).

OBJETIVO

Determinar la relación entre el grado de reexpansión después de la desvitrificación y la tasa de embarazo de embriones transferidos en estadio de blastocisto.

MATERIAL Y MÉTODO

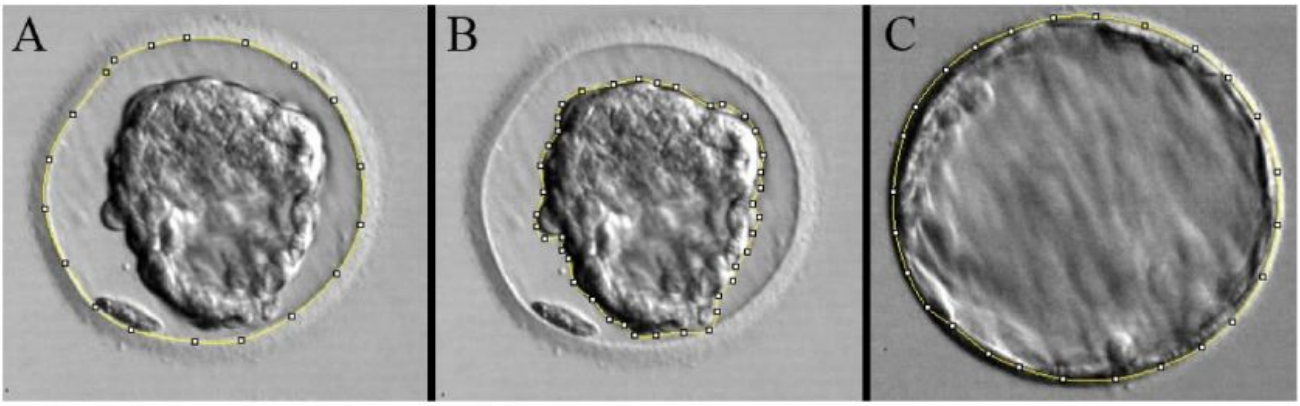
Este estudio recoge datos prospectivos desde enero del 2017 de ciclos de criotransferencia de blastocisto único con expansión del blastocele previtrificación de entre 3 y 5 y calidad de trofoectodermo y masa celular interna ≥ B (Gardner et al., 1998). El método utilizado para la vitrificación y desvitrificación fue el de Cryotop (Kitazato). Una vez desvitrificados, los blastocistos se mantuvieron un mínimo de dos horas antes de ser transferidos en medio Global suplementado con albumina (LifeGlobal). Mediante una cámara acoplada al microscopio invertido se capturó una imagen del blastocisto al finalizar el proceso de desvitrificación y otra, dos horas post desvitrificación. Finalmente, se midió de forma semiautomática el área que ocupaba el embrión antes y después de su reexpansión (Figura) utilizando Image J (software de diagnóstico de imágenes).

RESULTADOS

Se analizan un total de 86 ciclos. No se observan diferencias estadísticamente significativas en las tasas de embarazo en función del grado de expansión y la calidad de la masa celular interna y del trofoectodermo que presentaban los blastocistos previamente a su vitrificación. Tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas en la expansión del blastocisto justo después de la desvitrificación, siendo el grado de expansión de un 87 % en los ciclos con prueba de embarazo positiva y de un 82% en los ciclos con embarazo negativo.

No obstante, al valorar detalladamente la relación del grado de reexpansión del blastocisto dos horas post desvitrificación hemos sido capaces de establecer intervalos que muestran diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la tasa de embarazo. De este modo se ha comprobado que: blastocistos con una reexpansión menor al 83,6% tienen tasas de embarazo del 50%, blastocistos que reexpanden entre el 83,7% y el 117,8% tienen una tasa de embarazo del 60,6%, blastocistos reexpandidos entre el 117,9% y el 152,0% tienen una tasa de embarazo del 73,3% y finalmente, los blastocistos con mayor reexpansión (>152,1%) elevan su tasa de embarazo hasta el 87,5%.

Figura. Análisis de la reexpansión de blastocistos desvitrificados. Se captura una imagen del estado post desvitrificación del blastocisto (A, B) y otra dos horas después (C). De la primera imagen se extraen la medida referencia de expansión 100% (A) y la medida de expansión post desvitrificación (B) mientras que de la segunda se obtiene la medida de expansión 2h-post desvitrificación.



Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CONCLUSIONES

Los hallazgos de este estudio nos ofrecen una aproximación fiable para evaluar las probabilidades de embarazo de embriones desvitrificados en estadio de blastocisto. Esta herramienta otorga a nuestro centro una nueva vía de conocimiento de cara a informar de forma más veraz a nuestros pacientes sobre las posibilidades de éxito en ciclos de criotransferencia de blastocistos.

BIBLIOGRAFÍA

Ahlström et al., Hum Reprod 2013;28:1199–1209.

Gardner et al., Fertil Esteril 1998;13:3434-3440.

Yin et al., CERM 2016;43:31-37.

Qing-Yun Du et al., Fertil Esteril 2016;105:910-919.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-23: EL ANÁLISIS DE BLASTOCISTOS DESVITRIFICADOS POR MORFOLOGÍA DINÁMICA CON MONITORIZACIÓN CONTINUA PERMITE DEFINIR NUEVAS VARIABLES CUANTITATIVAS RELACIONADAS CON LA IMPLANTACIÓN

A Coello Perles, A Cobo Cabal, A Galán Rivas, L Alegre Ferri, M Nohales Corcoles, M Meseguer Escrivá
IVI Valencia, Valencia

INTRODUCCIÓN

La tecnología time-lapse nos permite evaluar la dinámica de re-expansión de los blastocistos desvitrificados. Esta información puede ser de gran utilidad para identificar las variables implicadas en el proceso, así como el rango de valores asociado a una mayor tasa de implantación.

OBJETIVO

Estudiar la dinámica de re-expansión de los blastocistos desvitrificados e identificar variables cuantitativas predictivas de implantación. Además, usando los parámetros más predictivos, desarrollar un modelo jerárquico que clasifique los blastocistos desvitrificados en categorías con diferente potencial implantatorio.

MATERIAL Y MÉTODO

El estudio incluyó 435 blastocistos desvitrificados, con tasa de implantación conocida, evaluados con sistema time-lapse. Los blastocistos fueron vitrificados y desvitrificados con el método Cryotop® (KitazatoBiopharma), y posteriormente se cultivaron en incubadores Embryoscope® (Vitrolife, Dinamarca) hasta el momento de la transferencia. Las variables analizadas incluyeron: grosor de la zona pelúcida (ZP) inicial (inmediatamente después de la desvitrificación) y final (en el momento de la transferencia) (µm), área del blastocisto inicial y final (µm2), área de la masa celular interna (mci)(µm2), tiempo de expansión (h), presencia de colapsos o contracciones. Después de definir rangos óptimos según los cuartiles consecutivos con mayor probabilidad de implantación, se realizó una regresión logística combinando las variables anteriormente mencionadas, con tal de identificar las más predictivas para desarrollar un modelo jerárquico. Posteriormente, utilizando otro set de embriones (181 blastocistos desvitrificados) se evaluó el modelo creado con el fin de validar su sensibilidad.

RESULTADOS

Observamos que la re-expansión de los blastocistos desvitrificados está fuertemente correlacionada con la implantación (44.6% los que re-expanden vs. 6.5% los que no re-expanden; $p<0.05$). Sin embargo, el momento de inicio de la re-expansión no afectó significativamente a los resultados clínicos. La tasa de implantación se incrementó significativamente (44,4% vs. 30,9%) en blastocistos con grosor inicial de ZP < 19 µm, como también se registró un aumento en esta tasa (44,2% vs. 33,3%) con valores de área inicial > 9900 µm2. La tasa de implantación también fue significativamente más elevada (46,8% vs. 34,3%) cuando el grosor final de la ZP < 12 µm y el área final del blastocisto > 14598 µm2 (45,2% vs. 29,3%). La presencia de colapsos y el área de la mci no se relacionó con el éxito reproductivo. A través de regresión logística se identificó el área final del blastocisto seguida del área inicial como las variables más predictivas de implantación. Con estos datos, creamos un modelo que dividía los embriones en cuatro categorías desde la A, a la D con decreciente potencial de implantación (47,3% para A, 43,7% para B, 32,8% para C y 14,2% para D). La validación del modelo presentó un coeficiente de correlación con respecto al modelo original de 0,91.

CONCLUSIONES

El análisis de los blastocistos desvitrificados con sistema time-lapse proporciona nuevos marcadores predictivos de implantación y representa una alternativa a la evaluación morfológica mediante el establecimiento de valores cuantitativos objetivos vinculados con los resultados clínicos. El modelo creado puede ser de gran utilidad para proporcionar más información a los pacientes sobre sus opciones reproductivas, así como para considerar la transferencia de uno o dos embriones en las categorías con valores esperados de implantación más bajos.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-24: COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE VITRIFICACIÓN (CRYOTIP Y CRYOTOP) EN TRANSFERENCIAS DE EMBRIONES DE DÍA 3 Y BLASTOCISTO

A Martí Alemany, I Iniesta Mirón, I Peinado Casas, JV Martínez Sanchis, J Subirá Nadal, JM Rubio Rubio
Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de reproducción asistida han sufrido un gran aumento en los últimos años tanto en número de ciclos como en resultados. Uno de los campos más desarrollados ha sido el de la vitrificación.

Existen diferentes técnicas de vitrificación y desvitrificación así como diferentes soportes para realizarla. La elección del soporte más apropiado en cada laboratorio resulta de vital importancia para tener un buen programa de transferencia de embriones vitrificados y así aumentar la tasa de recién nacido vivo y sano por punción realizada.

OBJETIVO

Comparar la eficacia de dos sistemas de vitrificación (Cryotip y Cryotop) en un programa de transferencia de embriones propios vitrificados en día 3 y en estadio de blastocisto (día 5/6).

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio retrospectivo y comparativo de dos técnicas de vitrificación. Se compararon ambos sistemas de vitrificación en criotransferencias de embriones propios de día 3 y de día 5/6.

En día 3 se analizaron 211 criotransferencias:

Grupo I: Embriones vitrificados con el método Cryotip (n=123)

Grupo II: Embriones vitrificados con el método Cryotop (n=88)

En día 5 se analizaron 558 criotransferencias:

Grupo III: Blastocistos vitrificados con el método de Cryotip (n=492)

Grupo IV: Blastocistos vitrificados con el método de Cryotop (n=66)

Se estudiaron las siguientes variables: edad, tasa de supervivencia (TS), tasa de gestación (TG) y tasa de aborto clínico (TA). Se realizó un análisis estadístico con el programa SPSS 2.0. Se estableció un nivel de significatividad por debajo de 0,05.

RESULTADOS

En día 3, la media de edad de las pacientes fue de 35,08 para el grupo I y 34,93 para el grupo II no mostrándose diferencias significativas.

La TG del grupo I fue del 23,6% respecto al 35,2% del grupo II obteniéndose un p-valor de 0,064, muy cerca de ser significativo. La TS sí resultó ser significativa (P=0,02) siendo para el grupo I del 89,7% y del 97,8% para el grupo II. La TA fue para el grupo I del 31% y para el grupo II del 19,4% (P=0,296).

Para día 5, la media de edad del grupo III fue de 34,87 y para el grupo IV de 34,89 no mostrándose diferencias significativas. La TG para el grupo III fue de 26,4% y para el grupo IV fue de 34,8% (P=0,15). La TS fue del 98,2 % para el grupo III y del 100% para el grupo IV obteniéndose diferencias significativas (P=0,008). La TA fue del 26,1% y 26,2% para el grupo III y grupo IV respectivamente (P=0,1).

CONCLUSIONES

Las transferencias de embriones en día 3 y en estadio de blastocisto con el método CryoTop tienen una TG más alta que las realizadas con el método CryoTip aunque no existen diferencias significativas. Por otro lado, la tasa de supervivencia es significativamente superior en CryoTop respecto al CryoTip tanto en día 3 como en estadio de blastocisto. Para día 3, se observa una tasa de aborto superior para Cryotip aunque la diferencia no es significativa. Por tanto, se observa una tendencia de mejora de resultados con la utilización del método Cryotop.

Atendiendo a los resultados, el método de Cryotop sería el soporte de elección en nuestro laboratorio.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-25: TRANSFERENCIA EN FRESCO VS TRANSFERENCIA DIFERIDA

S Tabar Roquet, M Rius Mas, I Boiso Fedorovsky, C Mangrané Brasa, A Martí Ralda, M Martín Gallardo, J Herrero García, L Marquès Soler
Centro Reproducción Asistida Clínica Sagrada Familia, Barcelona

INTRODUCCIÓN

La transferencia diferida ha surgido como alternativa a la transferencia en fresco en los ciclos de FIV. Se ha optado por esta estrategia para evitar los efectos negativos de la estimulación ovárica sobre la receptividad endometrial y reducir el riesgo de hiperestimulación ovárica. Tras una transferencia sin éxito, se realizarán las criotransferencias necesarias hasta conseguir la gestación. Para determinar el éxito de un ciclo completo se estima la tasa acumulada de recién nacido vivo.

OBJETIVO

Comparar las tasas de gestación, aborto y recién nacido vivo de la primera transferencia embrionaria de ciclos de FIV en fresco vs ciclos con transferencia diferida. Determinar las tasas acumuladas de gestación, aborto y recién nacido vivo en los dos grupos de estudio.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio retrospectivo de pacientes que realizaron un ciclo de FIV con ovocitos propios, entre enero de 2013 y diciembre de 2015. Se incluyeron las pacientes que tuvieron un mínimo de 4 embriones evolutivos. Los datos se agruparon diferenciando las pacientes que realizaron transferencia en fresco (TF, n=226) y las que realizaron transferencia diferida (TD, n=152). Se determinaron las tasas de gestación, aborto y recién nacido vivo (RNV).

RESULTADOS

La edad media de las pacientes que realizaron TF fue de 35,8 años y las de TD de 34,6 años. No hay diferencias significativas en el número de embriones transferidos (1.82 vs 1.87, test exacto de Fisher, P=0.254) entre los dos grupos. Así mismo, no se detectan diferencias significativas en la tasa de gestación (48,7% vs 54,6%, test exacto de Fisher, P=0.294), en la tasa de aborto (8.9% vs 13.2%, test exacto de Fisher, P=0.232) y en la tasa de RNV (38.5% vs 39.5%, test exacto de Fisher, P=0.914). Los modelos de regresión logística ajustados para tener en cuenta simultáneamente el efecto de la edad, embriones transferidos, día de la transferencia y el número de embriones evolutivos de cada paciente, conducen a los mismos resultados: no se detectan diferencias significativas entre los grupos TF y TD (tasa de gestación: OR 1.02, 95% CI 0.63-1.65; tasa de aborto: OR 0.57, 95% CI 0.27-1.21; tasa de RNV: OR 1.32, 95% CI 0.80-2.17).

Se analizó el número de transferencias realizadas en la acumulada de los dos grupos (TF vs TD): una única transferencia 47.8% vs 55.3%, dos transferencias 44.2% vs 29.8%, más de 2 transferencias 8.0% vs 14.9%. TD presenta un mayor porcentaje de pacientes con más de 2 transferencias, pero se compensa con un menor porcentaje en el grupo de pacientes que realizaron 2 transferencias. La media de transferencias realizadas en los dos grupos (TF vs TD) es de 1.61 vs 1.60 y la media de embriones totales transferidos es de 2.96 vs 2.97.

No se observaron diferencias significativas entre los grupos TF y TD en la tasa acumulada de gestación (73.5% vs 74.6%, test exacto de Fisher, P=0.896), en la tasa acumulada de aborto (18.58% vs 21.05%, test exacto de Fisher, P=0.663) y en la tasa acumulada de RNV (56.2% vs 57.9%, test exacto de Fisher, P=0.817). Los modelos de regresión logística ajustados para tener en cuenta simultáneamente el efecto de la edad, el número transferencias realizadas, día de la transferencia y el número de embriones evolutivos, conducen a los mismos resultados: no se detectan diferencias significativas entre los grupos TF y TD (tasa de gestación: OR 1.32, 95% CI 0.74-2.37; tasa de aborto: OR 0.95, 95% CI 0.47-1.92; tasa de RNV: OR 1.27, 95% CI 0.72-2.26).

CONCLUSIONES

Las tasas acumuladas de gestación, aborto y RNV son similares (no se detectan diferencias significativas) en pacientes que realizaron transferencia en fresco respecto a pacientes que realizaron transferencia diferida.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-26: COMPARACIÓN DE LOS PARÁMETROS ESPERMÁTICOS TRAS LA CONGELACIÓN LENTA Y LA VITRIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES

A Genovés Pérez (1), I Martínez Rodero (1), S Arrones Olmo (1), C Olmedo Illueca (1), A García Molina (2), M Barea Gómez (1), S Royo Bolea (1), L Abad de Velasco (1), A Morales Vicente (1), I Cuevas Saiz (1)
(1) Hospital General Universitario de Valencia, (2) Proiser R+D, Paterna, Valencia

INTRODUCCIÓN

Diversos estudios muestran que el método más extendido para la preservación de espermatozoides, la congelación lenta, provoca daños físico-químicos en las estructuras intracelulares y la membrana plasmática. Debido a este deterioro que sufren las células, en las muestras descongeladas se observan la motilidad y la supervivencia disminuidas y la fragmentación del DNA aumentada respecto al estado en fresco. Por el contrario, diferentes publicaciones evidencian que la vitrificación de espermatozoides preserva adecuadamente la funcionalidad espermática, manteniendo la motilidad y supervivencia, además de generar baja fragmentación del DNA. A pesar de ello, la vitrificación no se ha extendido en la práctica clínica debido a la baja concentración y reducido volumen de vitrificación por pajuela necesarios para que la técnica sea efectiva.

OBJETIVO

Comparar los efectos de la técnica de vitrificación sobre los parámetros de motilidad, supervivencia y fragmentación del DNA con respecto a la congelación lenta.

MATERIAL Y MÉTODO

Se testaron 9 muestras de semen de distintos pacientes, que se dividieron en 3 fracciones: para valoración en fresco, para congelación lenta y para vitrificación.

La congelación lenta y la vitrificación se realizaron acorde con los protocolos establecidos por la unidad. El medio de vitrificación utilizado estaba compuesto por medio de cultivo al que se añadió crioprotector no permeable y proteínas: sacarosa y dextrano respectivamente. El medio de congelación utilizado fue Irvine® Sperm Freezing.

Posteriormente, se descongelaron y desvitrificaron las muestras para valorar los parámetros incluidos en el estudio.

Los parámetros espermáticos valorados en todos los casos fueron: motilidad (CASA system: ISASv1 Proiser R+D®), supervivencia (test hipoosmótico) y fragmentación del DNA (kit Halosperm G2®).

Finalmente, se analizaron los valores obtenidos en cada caso mediante un test t-Student y un test Kruskal-Wallis utilizando el paquete estadístico SPSS® versión 15.0.

RESULTADOS

Se observó un aumento estadísticamente significativo en la fragmentación del DNA en el grupo descongelado (18,39 ± 4,76%) frente al desvitrificado (10,05 ± 2,38%) y al fresco (8,96 ± 2,63%). Asimismo, se observaron diferencias estadísticamente significativas para los valores de motilidad A+B en las muestras en fresco (39,67 ± 27,19%) frente las muestras descongeladas (9,67 ± 7,94%) y desvitrificadas (12,75 ± 11,58 %), aunque no así entre estas dos últimas. Respecto a la vitalidad, los valores medios fueron 79,07 ± 7,83% en fresco, 41,44 ± 7,83% descongelado y 43,76 ± 9,14% desvitrificado, y se vio que esta variable se comportaba como la motilidad; no hubo diferencias significativas entre descongeladas y vitrificadas, aunque sí con respecto a la muestra en fresco.

CONCLUSIONES

Los resultados de este análisis preliminar apuntan a un aumento en la fragmentación del DNA debido al proceso de congelación lenta. En cambio, con la técnica de vitrificación, la fragmentación del DNA no se ve prácticamente incrementada. En cuanto al resto de parámetros medidos en el ensayo, motilidad y vitalidad, se ven igualmente alterados tras la vitrificación y la congelación lenta. Aunque son necesarios más estudios que confirmen estos datos, los resultados obtenidos apuntan que la vitrificación puede reducir la fragmentación del DNA respecto a la congelación lenta. Por ello, parece razonable trabajar en la optimización del protocolo de vitrificación a fin de mejorar su aplicabilidad en la práctica clínica.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-27: VALIDACIÓN DE UN NUEVO PROTOCOLO BASADO EN SECUENCIACIÓN MASIVA PARA EL DGP DE REORDENAMIENTOS CROMOSÓMICOS ESTRUCTURALES Y SEGMENTOS INTRACROMOSÓMICOS: EL DGP DE ALTA RESOLUCIÓN.

X Vendrell Montón (1), V Fernández-Pedrosa (1), JC Triviño (1), R Bautista-Llácer (1), C Collado (1), O Rodríguez (1), E García-Mengual (1), M Benavent (2), J Pons (2), MC Cañadas (3)
(1) Sistemas Genómicos, Paterna, Valencia (2) Ginemed, Valencia, (3) Ginefiv, Madrid

INTRODUCCIÓN

La secuenciación genómica masiva (NGS, Next Generation Sequencing) ha irrumpido de forma exponencial, representando un cambio de paradigma en Genética. El caso de la Genética Reproductiva no es una excepción. En este contexto, el estudio del estatus cromosómico de los embriones mediante NGS ha permitido una globalización del ensayo, estableciendo la euploidía como un criterio de selección, acercándonos al concepto de eSET (elective Single Embryo Transfer). No obstante, los fabricantes de los kits de análisis especifican que los métodos no están validados para la detección de reordenamientos cromosómicos desequilibrados y perdidas/ganancias de segmentos intracromosómicos. Esto hace necesario validar los procedimientos en estos casos, antes de su traslado a la práctica clínica. La novedad de este trabajo consiste en el desarrollo de un protocolo original, un algoritmo bioinformático y un visor cromosómico propios para detectar variaciones en el número de copias a lo largo de los cromosomas, estableciendo claramente los puntos de corte.

OBJETIVO

Presentar la validación de un nuevo método de estudio cromosómico de alta resolución, basado en la NGS a baja cobertura, para identificar las coordenadas genómicas de los puntos de corte de los reordenamientos cromosómicos desequilibrados y perdidas/ganancias de segmentos intracromosómicos, en muestras de embriones humanos en estadio preimplantación.

MATERIAL Y MÉTODO

La variedad de tipos de muestras y de reordenamientos cromosómicos conocidos es crucial en este tipo de validaciones. Se incluyeron: 1) embriones desequilibrados procedentes de progenitores portadores de reordenamienos equilibrados: 46,XY,t(2;8)(q13;p11.2) (n=4); 46,XY,t (1;14)(q25;q23) (n=3); 2) líneas celulares linfoides desequilibradas procedentes de pacientes: 46,XX,ins(6;3)(p11.1;q27q25) (n=1); 46,XX,t(9;22)(q21.3;p12.1) (n=1); 3) blastómeros únicos (n=19) y muestras de trofectodermo (n=18) que presentan ganancias/pérdidas de segmentos intracromosómicos. Se procedió a la amplificación genómica completa y la fabricación de librerías de fragmentos en el mismo paso, mediante un sistema MALBAC-like que permite añadir simultáneamente los adaptadores y secuencias índice para la posterior secuenciación en la plataforma MiSeq® (Illumina). La calidad/cantidad se valoró en Qubit® y Bioanalyzer®. La mezcla equimolar se sometió a bridge-PCR para la amplificación clonal. La secuenciación fue mediante SBS (Sequencing by Synthesis) y paired-ends (150nt x2). Se estimó el porcentaje de lecturas mapeadas (properly-paired), distribución homogénea/cromosoma y cobertura/kilobase. En el caso de las translocaciones y la inserción, las muestras se estudiaron simultáneamente por técnicas de CGHa (24sure+®, Illumina) para establecer la concordancia. Para acotar las coordenadas genómicas en los extremos de los reordenamientos, se diseñó un algoritmo bioinformático ad hoc y un visor de citobandas cromosómicas específico.

RESULTADOS

El rendimiento de la secuenciación se resume en datos medios: densidad de los clusters: 821,2(K/mm2); número de clusters 15,9 (M); número de clusters PF (passing filters): 13.9 (M); porcentaje de clusters PF: 87,4 %; número de nucleótidos secuenciados: 4.4 (Gb); índice Q30 (menos de 1 error de mapeo cada 1000 nucleótidos): 91% y cobertura del genoma: 0.048. Todos los parámetros superaron ampliamente los valores umbrales establecidos. Las lecturas se dividieron en ventanas de 500 kb y se generaron cromosomas virtuales por alineamiento de las lecturas frente al genoma de referencia GRCh38. Se establecieron líneas de normalidad (euploidía) en una escala linear (no logarítmica) expresada en número de copias. Se definieron los umbrales de confianza por cromosoma y la probabilidad de aneuploidía parcial, así como el MCD (Mean of Chromosome Dispersion) como índice de fiabilidad de las lecturas. Las coordenadas génicas del punto de inicio/fin del reordenamiento se establecieron en todos los casos con una resolución mínima de 1,5 Mb.

CONCLUSIONES

El nuevo protocolo basado en NGS de alta resolución permite identificar de forma sensible, específica, precisa y reproducible, las coordenadas genómicas que acotan los reordenamientos intracromosómicos desequilibrados. Puede ser utilizado de forma segura para el DGP de reordenamientos cromosómicos.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-28: DETECCIÓN DE MOSAICISMO CROMOSÓMICO EMBRIONARIO MEDIANTE NEXT-GENERATION SEQUENCING (NGS): INFLUENCIA SOBRE LA TASA DE RECIÉN NACIDO VIVO

R Morales Sabater, B Lledó Bosch, JA Ortiz Salcedo, J Ten Morro, J Llácer Aparicio, R Bernabeu Pérez.
Instituto BERNABEU, Alicante

INTRODUCCIÓN

Las aneuploidías cromosómicas son frecuentes en embriones humanos, y son una de las causas de las tasas de éxito relativamente bajas de los ciclos de fecundación in vitro. El diagnóstico cromosómico completo del embrión mediante la técnica de hibridación genómica comparada por array (aCGH) se usa para seleccionar embriones euploides con la finalidad de mejorar los resultados clínicos de los ciclos FIV. Sin embargo, un porcentaje de blastocistos euploides y morfológicamente normales no implantan o dan lugar a un aborto. Una posible explicación para estos fallos tras la transferencia de embriones euploides se ha atribuido a la existencia de mosaicismo cromosómico que consiste en una mezcla de células diploides y aneuploides en el embrión, que se origina durante la división embrionaria. La incorporación de la técnica de next-generation sequencing (NGS) al DGP ha mejorado la detección de embriones mosaico en comparación con la técnica de aCGH ya que posee una mayor sensibilidad.

OBJETIVO

Los objetivos del presente estudio han sido determinar si la técnica de NGS es capaz de detectar el mosaicismo de bajo grado, indetectable por aCGH, y si la transferencia de los embriones mosaico de bajo grado afecta a la tasa de recién nacido de forma significativa.

MATERIAL Y MÉTODO

Se reanalizaron por NGS biopsias de trofoectodermo de blastocistos (día 5 y 6) analizados previamente por aCGH (febrero 2014- marzo 2016). Se incluyeron 85 blastocistos euploides analizados por aCGH de pacientes que no consiguieron embarazo (n=46) y pacientes que tuvieron un embarazo a término (n=39). En todos los casos se realizó la transferencia de un solo embrión. Se consideró un embrión mosaico cuando el porcentaje estimado de células aneuploides fue entre 20% y 70%. El DNA genómico amplificado (conservado a -80ºC) fue reanalizado por NGS. La técnica de NGS se realizó siguiendo el protocolo VeriSeq y usando el secuenciador MiSeq (Illumina). El análisis se llevó a cabo usando el software BlueFuse Multi de Illumina. Las diferencias entre grupos fueron evaluadas usando los test estadísticos chi-cuadrado de Pearson y t-student (SPSSv20.0).

RESULTADOS

Las muestras de DNA de biopsias de trofoectodermo procedentes de blastocistos euploides (día 5 y 6) diagnosticados por aCGH se reanalizaron por NGS. Se detectó mosaicismo cromosómico en 24 blastocistos (28,2%). En todos los casos el porcentaje de células aneuploides fue entre el 20 y 40% (mosaicismo de bajo grado). En el grupo de embriones euploides que no dieron lugar a embarazo se detectaron 15 embriones mosaico (32,6%), y 9 en el grupo de embriones que dieron lugar a un embarazo a término (23,1%). El porcentaje de embriones mosaico de bajo grado parece ser superior entre los pacientes que no consiguieron embarazo que entre los pacientes que consiguieron embarazo a término (32,6% vs 23,1%), sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa (p=0,33). No se observaron diferencias significativas entre grupos (no embarazo vs embarazo a término) con respecto a la edad materna (29,5 vs 29,3, p=0,89), edad paterna (41,8 vs 39,5, p=0,07), MII recuperadas (10,9 vs 10,7, p=0,79) y el porcentaje de embriones de buena calidad transferidos (p=0,16).

CONCLUSIONES

La NGS es más eficiente para detectar mosaicismo cromosómico que la técnica aCGH. Sin embargo, según nuestros datos, la transferencia de embriones mosaico de bajo grado detectados por NGS no afecta a la tasa de embarazo a término o recién nacido vivo. Por tanto, la transferencia de embriones mosaico de bajo grado no debería evitarse hasta obtener más datos de los resultados de los ciclos FIV tras la transferencia de estos embriones.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-29: PARÁMETROS EMBRIONARIOS QUE AFECTAN A LA TASA DE ANEUPLOIDÍAS DE LOS BLASTOCISTOS HUMANOS

A Delgado Mendive, A Mercader Bayarri, L Escrich Albelda, P Buendía Segura, D Beltrán Torregrosa, N Grau Grau, F Insua Piotti, MJ De los Santos Molina
IVI VALENCIA, Valencia

INTRODUCCIÓN

A pesar de que los embriones humanos no tienen controladores del ciclo celular muy robustos, se sabe que las anomalías cromosómicas inducen un bloqueo en el desarrollo embrionario, de manera que éstas, se detectan con mayor frecuencia en embriones con morfología subóptima y en aquellos que se han bloqueado durante el cultivo. De hecho, la tasa de anomalías en los blastocitos humanos oscila entre un 10% y un 20 %, siendo menor que la encontrada en estadios más tempranos. Aun así, las anomalías cromosómicas persisten en los blastocistos humanos y su incidencia puede variar de acuerdo a ciertos parámetros tanto intrínsecos como extrínsecos al propio embrión.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio fue evaluar qué parámetros evolutivos y morfológicos embrionarios podían afectar a la tasa de aneuploidías en los blastocistos humanos.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio retrospectivo que comprendió un total 1.349 blastocistos de 416 ciclos del programa de Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) realizados entre noviembre de 2016 y enero 2017. Las indicaciones fueron: edad materna avanzada (n=229), fallo de implantación (n=71), factor masculino (n=44), aborto de repetición (n=37), presencia de aneuploidía previa (n=22), FISH de espermatozoides anormal (n=7), otros (n=6). Las siguientes variables independientes tales como la calidad del trofoectodermo (TE) y la masa celular interna (MCI), y los días necesarios para alcanzar la expansión del blastocele, fueron analizados siguiendo los criterios de ASEBIR modificados, de manera que la calidad de los blastocistos se basó solo en criterios morfológicos. Se emplearon el Test de Chi cuadrado y modelos de análisis de regresión logística binaria para la evaluación de las variables independientes sobre la tasa de aneuploidía. Los valores de $p<0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

En general, la tasa de embriones aneuploides fue mayor en los embriones de día 6 (60.12%) comparado con los de día 5 de desarrollo (51.65 %), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p <0.05$). Tanto la calidad del TE como la calidad de la MCI, mostraron estar asociados con las tasas de aneuploidía, siendo éstas menores a medida que mejoraba la calidad de éstos, tanto en día 5 (TE A 57,14%, TE B 53,43%, TE C 36,55% , MCI A 73,58%, MCI B 48,62%, MCI C 41,51%), como en día 6 (TE A 77,78%, TE B 53,27%, TE C 28.42%, MCI A 75,86%, MCI B 44,7%, MCI C 29,35%). El análisis de regresión logística binaria arrojó un mayor valor pronostico del TE sobre la euploidía tanto en día 5 como en día 6, siendo éste mayor en día 6. Los valores de las odds ratio para los embriones de día 5 fueron (TE A 0.189, TE B 0.22 y TE C 0.23) y en día 6 (TE A 4.00, TE B 2.32, TE C 0.960).

CONCLUSIONES

Los datos obtenidos de este estudio apoyan la clasificación de ASEBIR en tanto que muestran una asociación entre calidad de TE y el índice de aneuploidías, lo cual también correlaciona con mejores tasas de implantación esperadas en blastocistos con TE que presentan mayor índice mitótico.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-30: HERENCIA EPIGENÉTICA TRANSGENERACIONAL POR VÍA PATERNA: LA PARTE LAMARCKISTA DEL ESPERMATOZOIDE

J Blanco Rodríguez (1), R Aiese Cigliano (2), N Garrido Puchalt (3), C Camprubí Sánchez (4)
(1) Genetics of Male Fertility Group, Unitat de Biologia Cel·lular (Facultat de Biociències), Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Cerdanyola del Vallés, Barcelona, (2) Sequentia Biotech, Edificio Eureka, Campus UAB, 08193-Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), (3) IVI Foundation, Parc Científic Universitat de València, 46980-Paterna, (4) GenIntegral, Barcelona / Genetics of Male Fertility Group, Unitat de Biologia Cel·lular (Facultat de Biociències), Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra (Cerdanyola del Vallès)

INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides son células altamente diferenciadas cuya función principal consiste en aportar al ovocito el genoma paterno. Además de la carga genética, el espermatozoide libera otros componentes celulares como el centriolo, PLC-Z, moléculas de señalización, factores de transcripción, un perfil epigenético característico y una población compleja de moléculas de RNA. Estos componentes intervienen de forma coordinada en los procesos de fecundación, activación del ovocito y desarrollo embrionario temprano. Las características epigenéticas de los espermatozoides son el resultado de los períodos de reprogramación que se producen durante la diferenciación de las células germinales primordiales (PGCs) y la espermatogénesis. No obstante, los fenómenos de reprogramación no son totales sugiriendo la idea de que algunas marcas epigenéticas se transmiten entre generaciones. La existencia de factores ambientales con efectos transgeneracionales sugiere la existencia de mecanismos de herencia transgeneracional de base epigenética. Datos recientes han identificado en PGCs regiones codificantes resistentes a la reprogramación lo que sugiere la posibilidad que los genes contenidos en estas regiones sean transmitidos a la descendencia con las marcas epigenéticas de generaciones anteriores.

OBJETIVO

Analizar en DNA procedente de espermatozoides el estado de metilación de las Citosinas (CpGs) presentes en las regiones codificantes resistentes a la reprogramación descritas en PGCs. La consecución de este objetivo permitirá comprobar si la resistencia a la reprogramación persiste a lo largo de la espermatogénesis, y por lo tanto, valorar si los genes anotados a estas regiones son candidatos a herencia epigenética transgeneracional.

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron muestras de semen procedentes de 19 individuos control que se procesaron y analizaron de forma independiente. La extracción del DNA espermático se realizó con el kit Puregene (Gentra Systems). El DNA espermático se modificó mediante bisulfito sódico utilizando el Kit EZ DNA Methylation-Direct (Zymo Research) y se analizó mediante el array de metilación Infinium HumanMethylation450 BeadChip (Illumina) y la plataforma Illumina iScan SQ. Las intensidades de fluorescencia de cada CpG se extrajeron utilizando el software GenomeStudio (Illumina) y se convirtieron en valores que oscilaron entre 0 (ausencia de metilación) y 1 (metilación total). A continuación identificamos las CpGs analizadas en el array 450K presentes en las 602 regiones codificantes resistentes a la reprogramación descritas en PGCs humanas (datos facilitados por Sabine Dietmann y Azim Surani). Las regiones se clasificaron como resistentes a la reprogramación cuando el valor promedio de las CpGs contenidas en cada región fue superior o igual a 0,8 en todas las muestras analizadas.

RESULTADOS

Identificamos un total de 1.748 CpGs en el array 450K que se distribuyeron en las 602 regiones codificantes descritas en PGCs. En DNA espermático, 134 regiones (22%) presentaron un valor promedio de metilación $\geq$ 0,8 en todas las muestras analizadas. Es decir, correspondieron a regiones que no están sujetas a reprogramación, ni durante el desarrollo de las PGCs ni durante la espermatogénesis. Las 134 regiones identificadas contenían un total de 94 genes. El análisis de ontología génica reveló que 52 genes son de expresión cerebral. Además, presentaron una asociación con enfermedades relacionadas con el consumo de tabaco (24 genes), alcohol (6 genes), trastornos bipolares/esquizofrenia (3 genes), y diabetes mellitus tipo 2 (4 genes).

CONCLUSIONES

Existe un grupo de 94 genes que se transmiten por vía paterna que son resistentes a los procesos de reprogramación epigenética y que por tanto transmiten las marcas epigenéticas inalteradas entre generaciones. Aunque las implicaciones de estos resultados todavía son inciertas, el hecho que la mayoría sean de expresión cerebral, relacionados con procesos de dependencia y alteraciones conductuales, sugiere un peso significativo de este tipo de herencia en patología humana.

AGRADECIMIENTOS

PS09/00330 (Gobierno de España); SGR2014-524 2 (Generalitat de Catalunya).

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-31: PRE-CONCEPTIONAL OOCYTE DIAGNOSIS ON FRESH OR CRYOPRESERVED OOCYTES

L Escrich Albelda (1), Y Galiana Briones (2), N Grau Grau (1), N Soler Balaguer (1), F Insúa Piotti (1), A Mercader Bayarri (1), A Delgado Mendibe (1), D Castelló Salom (1), M Nohales Corcoles (1), MJ Escribá Pérez (1)
(1) IVI-Valencia, Valencia, (2) IVI-Bilbao, Bilbao

INTRODUCTION

The increasing patient requests for screening of genetic recessive diseases make the pre-conceptional genetic diagnosis (PCGD) of the oocyte, a feasible technological strategy to avoid the transmission of mutations to descendants. PCGD includes the biopsy of the first polar body (1PB) and an efficient cryopreservation protocol of biopsied oocytes, until the genetic results were available. As most of the current patients, cryopreserve their fertility, the technical set up of the PCGD on previously cryopreserved oocytes is also relevant for future clinical applications.

OBJECTIVES

To assess the PCGD on fresh or previously cryopreserved oocytes from a technological point of view.

MATERIAL AND METHODS

In this study, MII oocytes were provided by donors, discarded of our ovum donation program for carrying mutations in the X-chromosome. Two-hours after ovum pick-up, oocytes were denuded and MII oocytes were assigned to one of the five experimental groups. In group A, fresh oocytes were biopsied for PCGD; briefly, the zona pellucida was opened by application of laser shoots and throughout the hole, the 1PB was removed by micromanipulation; within the following 30 minutes after biopsy, oocytes were vitrified. In group B, MII oocytes were vitrified and, 2-hours after warming, those survived oocytes were PCGD following the methodology described above. Control groups were compiled by oocytes that had not been biopsied or vitrified (Group C); oocytes that had not been biopsied, but were vitrified once (Group D) or twice (Group E).

PRE-CONCEPTIONAL OOCYTE DIAGNOSIS ON FRESH OR CRYOPRESERVED OOCYTES

Experimental Group	1 P B biopsy	No. of vitrifications	SR (%)	AR (%)
Group A (n=34)	1	1	16 (47.1) b	10 (62.5) b
Group B (n=29)	1	2	17 (58.6) b	12 (70.6) b
Group C (n=20)	0	0	N/A	12 (60.0) bc
Group D (n=16)	0	1	16 (100) a	4 (25.0) c
Group E (n=22)	0	2	21 (95.4) a	21 (100) a

Two hours after warming, the survival rate was assessed and those survived oocytes were artificially activated by A23187 and puromycin incubations, in order to assess their competence to response to an artificial oocyte activation (AOA) protocol, avoiding the creation of embryos.

The survival and oocyte activation rates were compared amongst all experimental groups, using the Chi-square test. The Yates' correction for continuity was used when appropriate.

RESULTS

Table shows the survival rates (SR) and the activation rates (AR), calculated as a percentage of survived oocytes for every experimental group.

There was a significantly detrimental effect of the PCGD on the survival rates, regardless of that a prior vitrification procedure had been applied. Oocytes vitrified at once or twice, survived at comparable rates (averaged: 97.4%; $p>0.05$).

Concerning the activation rates, the highest rates were observed in the double vitrification group (group E), followed by those PCGD groups (A & B). Those oocytes that were vitrified at once (group D) showed the lowest activation rates which were also comparable to those control group C ($p=0.07$). These data suggested that the AOA here applied was inefficiency to display the oocyte activation response in such control groups. On the other hand, the high activation rates observed in PCGD groups as well as in those oocytes vitrified at twice suggested that such treatments induced certain degree of oocyte pre-activation.

CONCLUSIONS

The PCGD of fresh or previously vitrified oocytes compromises the oocyte survival and their subsequent competence to response to an AOA which might also affect the fertilization rates achieved by ICSI. The vitrification method, performed on biopsied oocytes should be revised and improved. Although double vitrification, in absence of PB biopsy, does not seems to affect the oocyte survival, it could compromise subsequent oocyte competence to be fertilized.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-32: ANÁLISIS 3D DE LA TERRITORIALIDAD CROMOSÓMICA EN CÉLULAS ESPERMATOGÉNICAS: EXPLORANDO LA INFERTILIDAD DESDE UN NUEVO PRISMA.

M Solé Canal (1), J Blanco Rodríquez (1), D Gil Resina (2), O Valero Coppin (3), G Fonseka (4), R Frodsham (4), F Vidal Domínguez (1), Z Sarrate Navas (1)

(1) Genetics of Male Fertility Group (http://gmfgroup.wixsite.com/gmfgroup). Unitat de Biologia Cel·lular. Universitat Autònoma de Barcelona. Cerdanyola del Vallès, Barcelona, (2) Centre de visió per computació. Departament de ciències de la computació. Universitat Autònoma de Barcelona. Cerdanyola del Vallès, España., (3) Servei d Estadística aplicada. Universitat Autònoma de Barcelona. Cerdanyola del Vallès, España., (4) Cytocell Ltd, Technopark, Newmarket Road, Cambridge CB5 8PB, UK.

INTRODUCCIÓN

Estudios de la organización cromosómica en núcleos de células somáticas han demostrado que los cromosomas ocupan regiones nucleares específicas llamadas territorios cromosómicos (CT). Los CT se disponen en patrones específicos no aleatorios según el tipo celular y están implicados en la regulación y el mantenimiento del genoma. Aunque hay datos preliminares que sugieren la importancia de la territorialidad cromosómica en la funcionalidad de las células germinales, las características del tejido testicular (presencia de distintos tipos celulares con diferentes características morfológicas, en diferentes estadios de desarrollo y, con dos tipos de ploidía) dificultan la consecución de resultados concluyentes. Además, la mayoría de los estudios se han llevado a cabo utilizando estrategias bidimensionales, en etapas específicas del proceso de la espermatogénesis y evaluando cromosomas concretos.

OBJETIVO

Desarrollar una metodología para abordar el estudio tridimensional de los CT a lo largo de los diferentes estadios del proceso de la espermatogénesis.

MATERIAL Y MÉTODO

Se disgregaron enzimáticamente los testículos provenientes de un ratón de la cepa C57BL/6J. Tras adherir las células obtenidas en portaobjetos polilisinizados, se realizó un proceso de fijación con paraformaldehído y un tratamiento de permeabilización con ácido clorhídrico, nitrógeno líquido y pepsina. Posteriormente, tres rondas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) se llevaron a cabo utilizando el kit personalizado *Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome Murine-System™* (Cytocell Ltd., Cambridge, UK). Este kit utiliza siete combinaciones diferentes de tres sondas de pintado cromosómico marcadas directamente con un fluorocromo diferente cada una (*AquaDEAC, FITC* y *TexasRed*). Seguidamente, se identificó la proteína SYCP3 (*Synaptonemal Complex Protein 3*) y la histona H1T (*Testis-Specific Histone*) mediante una tinción por inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos *Goat-Anti-Rabbit-IgG FITC* y *Goat-Anti-GuineaPig-IgG Cy3,* respectivamente, con el fin de distinguir diferentes tipos celulares según los distintos patrones de marcaje. Se capturaron secciones ópticas en serie de todos los tipos celulares con la utilización del microscopio confocal TCS-SP5 acoplado a un sistema de análisis de imágenes (*LAS AF-1.8.1*). Finalmente, las imágenes se procesaron mediante los softwares *ImageJ* y *Matlab* obteniendo datos numéricos, estadísticamente analizables, que definen los CT (datos descriptivos, posicionamiento radial y posicionamiento relativo de los cromosomas).

RESULTADOS

La utilización de portaobjetos polilisinizados permitió una buena adhesión de las células, sin deformar la morfología celular. Asimismo, el conjunto de técnicas utilizadas para conseguir una buena fijación y permeabilización de las células no modificó su integridad tridimensional.

El kit personalizado Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome Murine System™ permitió identificar todos los cromosomas de ratón en un solo portaobjetos. La realización de tres rondas sucesivas de FISH hizo posible la identificación de 9 CT por célula. Integrando todos los datos, se pudieron establecer relaciones de proximidad, dos a dos, entre todos los cromosomas del cariotipo de ratón.

La identificación de la proteína SYCP3 y de la histona H1T mediante una tinción por inmunofluorescencia permitió clasificar los tipos celulares en las siguientes categorías: células pre-meióticas, figuras meióticas (profase I, metafase I y II), células post-meióticas y espermatozoides.

La utilización de los softwares ImageJ y Matlab permitió segmentar las imágenes obtenidas mediante el microscopio confocal TCS-SP5 y extraer datos numéricos de los CT en relación a las siguientes características tridimensionales: el volumen, la proporción de los cromosomas respecto al núcleo, la posición radial y la posición relativa de todos los cromosomas entre sí.

Resultados preliminares sugieren que los cromosomas presentan relaciones de proximidad conservadas que se mantienen a lo largo de las distintas etapas de la espermatogénesis.

CONCLUSIONES

La metodología desarrollada permite abordar el análisis tridimensional de todos los TC en los diferentes estadios del proceso de la espermatogénesis proporcionando nuevos fundamentos para el estudio de la relación entre el posicionamiento cromosómico, la regulación del genoma y la fertilidad.

AGRADECIMIENTOS

CF-180034(UAB), DPI2015-65286-R/ SAF2016-77165-P(MINECO) and CERCA(Generalitat de Catalunya).

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-33: PAREJAS ESTABLES DE MIRNAS: NUEVAS PERSPECTIVAS PARA ENCONTRAR BIOMARCADORES DE FERTILIDAD MASCULINA

C Corral Vázquez, A Salas Huetos, J Blanco, F Vidal, E Anton
Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola), Barcelona

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico de la infertilidad masculina se basa en la evaluación de parámetros seminales como la concentración, morfología y movilidad espermáticas. Sin embargo, a pesar de su uso extendido, la fiabilidad del seminograma para predecir la capacidad fértil del individuo presenta limitaciones que han llevado a cuestionar esta prueba como herramienta diagnóstica. Por este motivo, la búsqueda de biomarcadores de infertilidad a nivel molecular continúa siendo una de las prioridades en investigación aplicada, siendo el transcriptoma espermático una de las áreas de interés para este propósito. Diversos estudios han atribuido un rol biomarcador a ciertas parejas de mRNAs espermáticos que presentan una expresión relativa estable. Extrapolando este resultado al ámbito de los microRNAs (miRNAs), también se han hallado parejas de estos transcritos con expresión relativa estable en individuos fértiles. Sin embargo, el patrón de expresión de dichas parejas en espermatozoides de pacientes infértiles no ha sido verificado.

OBJETIVO

Identificar posibles biomarcadores de infertilidad masculina entre parejas de miRNAs espermáticos con expresión relativa estable en individuos fértiles cuya relación se rompa en individuos con distintas alteraciones de la fertilidad.

MATERIAL Y MÉTODO

Se obtuvieron muestras de semen procedentes de dos poblaciones: un grupo control de individuos fértiles (n=10) y una población de pacientes infértiles (n=38) subdivididos en astenozoospérmicos (n=10), teratozoospérmicos (n=10), oligozoospérmicos (n=10) y normozoospérmicos (n=8). La extracción de RNA espermático fue realizada mediante un protocolo estandarizado en nuestro laboratorio con los controles de calidad pertinentes. Se caracterizó el patrón de expresión de un total de 736 miRNAs vía qRT-PCR (TaqMan®). Las parejas de miRNAs ubicuos con expresión relativa constante en la población fértil se determinaron mediante un test de correlación de Spearman. Posteriormente se estableció cuáles de ellas no presentaban correlación significativa en ningún individuo infértil. De los miRNAs implicados en las parejas candidatas se evaluó su implicación en procesos biológicos mediante un análisis de ontología génica de sus genes diana.

RESULTADOS

De las 48 parejas que mantuvieron una correlación estable en la población fértil, 12 de ellas presentaban una disrupción de su ratio de expresión en todos los individuos infértiles. Los análisis de ontología génica mostraron que los miRNAs hsa-miR-20a-5p y hsa-miR-106a-5p presentaban el mayor grado de coincidencia de sus genes diana con un 79.42% y un 71.91% respectivamente. De todos los miRNAs implicados en las 12 parejas candidatas, se observó que hsa-miR-92a-3p y hsa-miR-125b-5p aparecían en distintas parejas (3 apariciones cada uno). Al valorar la oscilación de los valores de correlación Rho, se observó que la pareja formada por hsa-miR-92a-3p y hsa-miR-125b-5p presentaba unos valores de correlación con un valor absoluto bastante inferior al valor umbral ($Rho_{astenozoospermia}=0.648$; $Rho_{oligozoospermia}=0.539$; $Rho_{teratozoospermia}=0.673$; $Rho_{normozoospermia}=0.119$; $Rho_{umbral}=0.915$).

CONCLUSIONES

Se han caracterizado 12 parejas de miRNAs con una relación de expresión estable en espermatozoides de hombres fértiles, cuya correlación se rompe en espermatozoides de individuos infértiles de etiología variada. En concreto, la pareja formada por hsa-miR-92a-3p y hsa-miR-125b-5p resulta de especial interés como biomarcador de infertilidad debido a la mayor implicación de ambos miRNAs en distintas parejas.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-34: EFECTO DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES (COVS) SOBRE EL DESARROLLO DE LOS PRE-EMBRIONES HUMANOS

V Vásquez Cubillos (1), D Beltrán Torregosa (1), C Rubio Lluesa (2), L Rodrigo Vivó (2), A Mercader Bayarri (1), A Tejera Pastor (1), MJ De los Santos Molina (1)
(1) IVI Valencia, Valencia (2) Igenomix, Paterna, Valencia

INTRODUCCIÓN

Los COVs son sustancias que se convierten fácilmente en vapores o gases. A pesar de los esfuerzos para mantener la calidad del aire del laboratorio, los sistemas de cultivo embrionario siguen estando influenciados por el medio ambiente que les rodea y algunas sustancias nocivas pueden estar presentes en concentraciones, por lo general, muy por debajo de los valores límites admitidos (VLAs) ocupacionales, los cuales no son extrapolables para gametos ni pre-embriones. No obstante, pocos estudios han demostrado la correlación entre los COVs presentes en el laboratorio de fecundación in-vitro (FIV) y sus efectos sobre el desarrollo embrionario humano y tampoco se han determinado umbrales específicos para los compuestos que puedan afectar a los embriones humanos dentro del FIV.

OBJETIVO

Evaluar el efecto de COVs sobre desarrollo embrionario hasta blastocito y la tasa de aneuploidías de los mismos.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio prospectivo de toxicidad dosis-respuesta que incluye un total de 163 embriones humanos en día 3 (D3) de desarrollo, con 6- 10 células y <25% de fragmentación, donados a investigación. La edad media de las pacientes es de 37 años.

Un total de 150 embriones D3 fueron cultivados en presencia de Benceno (B) y Limoneno (L) respectivamente, utilizando 3 dosis diferentes basadas en los niveles encontrados en el exterior (E), laboratorio (L) y doble del laboratorio (D); así mismo 13 embriones fueron cultivados en medio control. Las concentraciones encontradas durante las mediciones de calidad del aire del FIV: para el benceno y el limoneno fueron las siguientes: BE=268*10-5ppm, BL=256*10-5ppm, BDL=512*10-5ppm y LE=87.5*10-5ppm, LL=113.6*10-5ppm, LD=226*10-5ppm.

La morfología embrionaria se evaluó utilizando los criterios de ASEBIR. Los embriones que llegaron a blastocisto fueron biopsiados y analizados mediante la técnica de Next Generation Sequencing (NGS). Para el análisis estadístico se utilizaron Chi cuadrado y test exacto de Fisher, valores de $p<0.05$ ( ) fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

La presencia de concentraciones de benceno y limoneno en los medios de cultivo afectaron de forma significativa al desarrollo embrionario y su morfología (Anexo: Tabla 1)

De 117 pre-embriones enviados para evaluar el perfil cromosómico, 3 dieron fallos de amplificación y se obtuvieron 114 resultados con una tasa de informatividad del 97,4%. Se encontraron entre 1 y 10 aneuploidías por embrión. Tasas de aneuploidías (Anexo: Tabla 2)

La presencia de benceno en el medio de cultivo dio lugar a un incremento significativo en el porcentaje de embriones aneuploides al comparar con el grupo de limoneno y el control.

CONCLUSIONES

Los pre-embriones humanos expuestos a medios de cultivo contaminados con dosis ambientales de COVs, tienen peor morfología y tasas de desarrollo reducidas. A pesar de esto, se pueden registrar embriones de muy buena calidad (A-A). Los resultados cromosómicos confirman que sí aumenta el porcentaje de aneuploidías con los embriones contaminados, especialmente ante benceno. Estos datos ponen en evidencia como concentraciones de contaminantes ambientales muy por debajo de los valores límites admitidos (VLAs) ocupacionales, pueden tener efectos nocivos sobre la salud de los pre-embriones que crecen en los laboratorios de FIV

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

ANEXO

Efecto de los compuestos orgánicos volátiles (COVs) sobre el desarrollo de los pre-embriones humanos

Grupo / Indicador	**Total grupo-C**	Total grupo-B	Total grupo-L	**BE**	**BL**	**BD**	**LE**	**LL**	**LD**
% de desarrollo hasta blastocisto	**100**	82,7	60(*)	**84**	**80**	**84**	**72**	**56(*)**	**56(*)**
% de expansión/ eclosión de blastocistos	**84,6**	56	38,7(*)	**64**	**48(*)**	**56**	**52**	**32(*)**	**32(*)**
% de embriones con “good score”	**46,2**	30,7	25,3	**36**	**12(*)**	**44**	**36**	**20**	**20**

Tabla 1. Porcentajes de embriones que se desarrollaron hasta estadio de blastocisto, según grupo experimental.

Grupo / Indicador	**Total grupo-C**	Total grupo-B	Total grupo-L	**BE**	**BL**	**BD**	**LE**	**LL**	**LD**
% Embriones aneuploides	**27,3**	44,4	16,3	**42,1**	**47,1**	**44,4**	**12,5**	**28,6**	**9,1**

Tabla 2. Porcentaje de embriones que presentaron aneuploidias, según grupo experimental.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-35: EFECTO DE LA CALIDAD DEL AIRE ATMOSFÉRICO EN LA FECUNDACIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO IN VITRO

S Novo Bruña, C Castelló Zupac, M Solans Pomares, A Farreras Ayestarán, JM Capdevila Vilana, M López-Teijón
Instituto Marques, Barcelona

INTRODUCCIÓN

Las concentraciones de compuestos orgánicos volátiles (COVs) como el benceno y pequeñas partículas (PM10) y otros compuestos como el dióxido de azufre (SO2), dióxido de nitrógeno (NO2), monóxido de nitrógeno (NO), ozono (O3), monóxido de carbono (CO), son comúnmente analizadas para evaluar la calidad del aire atmosférico.

Son diversas las relaciones que se han descrito hasta el momento entre los niveles de concentración de distintos componentes atmosféricos y efectos en la salud humana (Kampa & Castanas 2008). Menor es el número de estudios publicados en cuanto a la relación de la calidad del aire atmosférico con la tasa de éxito de las técnicas de reproducción asistida. La mayoría de estos estudios se centran exclusivamente en el efecto de los COVs en el ambiente y/o suministro de gases para incubadores (Esteves & Bento 2016). Legro y colaboradores publicaron en 2010 uno de los pocos estudios donde se contemplan otros compuestos contaminantes (Legro et al 2010), encontrando una correlación negativa entre la concentración atmosférica de NO2 y la tasa de nacidos vivos. No obstante, hasta el momento no se han descrito posibles efectos de los contaminantes atmosféricos a nivel de desarrollo embrionario, a excepción de los COVs.

OBJETIVO

Determinar los efectos de la concentración de varios componentes contaminantes del aire atmosférico colindante a un laboratorio de FIV en las tasas de fecundación y de blastocistos evolutivos in vitro.

MATERIAL Y MÉTODO

En este trabajo se presentan datos preliminares de un estudio retrospectivo que engloba ciclos de ICSI de donación de óvulos mantenidos en cultivo largo (Global - LifeGlobal) durante el primer semestre del 2016. Los valores de concentración de los compuestos registrados por la estación de medición más próxima al laboratorio (arriba mencionados), fueron facilitados por la "Secció d'Immissions del Servei de Vigilància i Control de l'Aire de la Direcció General de Qualitat Ambiental i Canvi Climàtic" (Generalitat de Catalunya). Para evaluar sus posibles efectos en la fecundación se utilizaron los valores de concentración en el día del ICSI, mientras que para evaluar los efectos en la tasa de blastocistos evolutivos se tuvieron en cuenta los valores de concentración de todos los días en que los embriones estuvieron en cultivo.

RESULTADOS

En este estudio preliminar se incluyeron un total de 376 ciclos. La tasa de fecundación no se vio afectada por las oscilaciones en la concentración de ninguno de los compuestos evaluados. Respecto a la tasa de blastocistos evolutivos, no se observó ninguna relación con componentes como los COVs, SO2, benceno y PM10. No obstante sí se detectó una correlación estadísticamente significativa entre la concentración de NO, NO2, CO y O3. Cuanto mayor era la exposición a contaminantes como el NO (>52µg/m3), el NO2 (>168µg/m3) o el CO (>2,5µg/m3) menor fue la tasa de blastocistos evolutivos lograda (descensos del 11,5%, del 7,9% y del 9,5% respectivamente), mientras que respecto al O3, a mayor concentración mayor tasa de evolutivos (>360µg/m3, aumento del 10,2%).

CONCLUSIONES

Ninguno de los contaminantes atmosféricos analizados tiene efecto en la tasa de fecundación de ciclos de reproducción in vitro. No obstante, se han detectado efectos adversos en la tasa de blastocistos evolutivos respecto al aumento de la concentración de NO, NO2 y CO, mientras que el aumento de la concentración de O3 tuvo el efecto inverso, aumentando la tasa de blastocistos evolutivos.

BIBLIOGRAFÍA

Esteves & Bento, Asian Journal of Andrology 2016 18:596-599.

Kampa & Castanas, Environmental Pollution 2008 151:362-367

Legro et al., Hum Reprod 2010 25:1317–1324

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-36: ¿EN QUÉ CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE EMBRIONES TEMPRANOS DIFIEREN CENTROS Y EXPERTOS?

L Martínez Granados (1), M Serrano Molina (2), A González Utor (3), N Ortíz Piñate (4), ML López Regalado (1), V Badajoz Liébana (5), L Marqués (6), H Gutiérrez Rodríguez (1), A Moral Fernández (1), JA Castilla Alcalá (7)
(1) Unidad de Reproducción Humana. UGC Laboratorio Clínico y UGC Obstetricia y Ginecología, HU Virgen de las Nieves. Granada, (2) Clínica IFEM, Córdoba, España, (3) MasVida Reproducción, Sevilla, España, (4) Instituto Europeo de Fertilidad, Madrid, España, (5) GINEFIV, Madrid, España, (6) CRA Clínica Sagrada Familia, Barcelona, España, (7) CEIFER biobanco, Granada, España.

INTRODUCCIÓN

La evaluación de la calidad embrionaria puede tener un componente subjetivo, al depender del criterio propio del embriólogo. Esto lleva a una variabilidad entre embriólogos cuando deben analizar dicha calidad. Con objeto de reducir esta variabilidad, diferentes sociedades científicas recomiendan la utilización de sistemas de catalogación estandarizados y la participación en Controles de Calidad Externos (CCE) de evaluación embrionaria. Por todo lo anterior, en el CCE de ASEBIR a partir del año 2012 se incorporó la clasificación embrionaria estandarizada publicada por ASEBIR, utilizándose además, la opinión de expertos como valores asignados.

OBJETIVO

Determinar el acuerdo entre centros y expertos en valoración de embriones tempranos analizando los resultados del programa de CCE para el laboratorio de reproducción de ASEBIR.

MATERIAL Y MÉTODO

Se analizan los datos recogidos en el Control de Calidad Externo de ASEBIR correspondientes a los años 2012-16, en los que participaron una media anual de 48 centros de forma voluntaria. En este control los centros tienen acceso a videos de embriones en día 2 y 3 en los que deben valorar, según los criterios de ASEBIR: asimetría de las blastómeras, porcentaje de fragmentación celular, multinucleación, vacuolas y catalogación global. Además deben elegir dos embriones para transferir (tanto en día 2 como día 3) y decidir sobre aquellos que no transfieren, si los crioconservarían o los descartarían. Se analizan en estos 5 años un total de 150 embriones.

Se considera para las variables analizadas, un valor resultado (la categoría más escogida por la mayoría de los centros) y otro de referencia (establecido por consenso entre un panel de expertos).

Para valorar la concordancia entre observadores, se calculó: índice Gwet, porcentaje de acuerdo, proporción de acuerdo positivo (probabilidad de coincidir cuando la característica está presente) (Ppos) y proporción de acuerdo negativo (probabilidad de coincidir cuando la característica está ausente) (Pneg), así como sus intervalos de confianza al 95%.

RESULTADOS

La concordancia entre centros y expertos en catalogación embrionaria según criterios de ASEBIR fue sustancial (Gwet día 2: 0.72; día 3: 0.79). Esta concordancia en día 2 y 3 no fue superior debido a un porcentaje de acuerdo ponderado bajo en embriones de categoría D. Sin embargo en las otras categorías este porcentaje de acuerdo fue superior a 0.9 en cualquier día del desarrollo.

El acuerdo entre expertos y centros, en las características morfológica analizadas es casi perfecto. Sin embargo, en multinucleación se observa un elevado porcentaje de acuerdo entre centros y expertos cuando no se presenta esta característica (0.99) pero se observa un bajo porcentaje de acuerdo cuando la multinucleación está presente según los expertos (0.41). De igual forma ocurre en la valoración de vacuolas. Se observan valores muy diferentes en multinucleación (0.96 vs 0.56 $p<0.05$) y vacuolas (0.97 vs 0.43 $p<0.05$) al analizar Ppos y Pneg. En fragmentación y asimetría estos estadísticos son similares.

La concordancia entre centros y expertos en decisión clínica fue moderado e inferior al observado en catalogación embrionaria (Gwet: día 2: 0.72 vs 0.49 ns; día 3: 0.79 vs 0.51 ns). Se observa una tendencia a un porcentaje de acuerdo entre centros y expertos más bajo cuando un embrión era crioconservado por los expertos tanto en día 2 (transferir: 0.77; crioconservar: 0.32; descartar: 0.82 $p<0.05$) como en día 3 (transferir: 0.73; crioconservar: 0.57; descartar: 0.67 ns).

CONCLUSIONES

Los CCE de embriología deberían incluir un mayor número de embriones con anomalías morfológicas que ayuden a los centros a mejorar su detección.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-37: RESULTADO DE LA VARIABLE ?ESTADIO ESPECÍFICO? DE LA CLASIFICACIÓN EMBRIONARIA DE ASEBIR 2015 EN EL PROGRAMA DE CONTROL DE CALIDAD EXTERNO DE MORFOLOGÍA EMBRIONARIA.

L Martínez Granados (1), M Serrano Molina (2), A González Utor (3), N Ortíz Piñate (4), ML López Regalado (1), V Badajoz Liébana (5), P Navas Bastida (1), M Navarrete Carmona (1), M Canales Gijón (1), JA Castilla Alcalá (6)
(1) Unidad de Reproducción Humana. UGC Laboratorio Clínico y UGC Obstetricia y Ginecología, HU Virgen de las Nieves.Granada, (2) Clínica IFEM, Córdoba, España. , (3) MasVida Reproducción, Sevilla, España., (4) Instituto Europeo de Fertilidad, Madrid, España., (5) GINEFIV, Madrid,España., (6) CEIFER biobanco, Granada, España.

INTRODUCCIÓN

La falta de simetría en la división de las blastómeras se asocia con una disminución en la capacidad implantatoria. En la actualidad diversas asociaciones científicas están introduciendo en sus sistemas de clasificación embrionaria el concepto de "estadio específico" (EE), en el que el tamaño de las células debe ser acorde al ciclo de división del embrión. Aquellos embriones EE tendrían un mayor potencial de implantación que aquellos que no lo son. En la última actualización (2015) de la catalogación embrionaria de ASEBIR se introduce este concepto, sustituyendo a la valoración de la asimetría de las blastómeras. Consideramos necesario conocer el acuerdo entre centros y expertos en la valoración del concepto EE.

OBJETIVO

Determinar la concordancia entre centros y expertos en la valoración del concepto "estadio específico" (EE), analizando los resultados del programa de Control de Calidad Externo para el laboratorio de reproducción de ASEBIR.

MATERIAL Y MÉTODO

Se analizan los datos recogidos en el Control de Calidad Externo de ASEBIR correspondientes a los años 2013-14 para asimetría y los años 2015-16 para el concepto EE. En los que participaron una media anual de 38 y 56 centros de forma voluntaria, respectivamente. En este control los centros tienen acceso a videos de embriones en día 2 y 3 en los que deben valorar, según los criterios de ASEBIR: asimetría de las blastómeras (iguales o desiguales) en los años 2013-14 y embrión EE (si o no) en los años 2015-16. Se estudian los embriones hasta 8 células (56 en 2013-14 y 53 en 2015-16). Se considera para la variable analizada, un valor resultado para los centros y otro de referencia. El valor resultado, corresponde a la categoría más escogida por la mayoría de los centros y el valor de referencia, se estableció por consenso entre un panel de expertos.

Para valorar la concordancia entre centros y expertos, se calculó: índice Gwet, porcentaje de acuerdo, proporción de acuerdo positivo (probabilidad de coincidir cuando la característica está presente) (Ppos) y proporción de acuerdo negativo (probabilidad de coincidir cuando la característica está ausente) (Pneg), así como sus intervalos de confianza al 95%.

RESULTADOS

La concordancia entre centros y expertos en asimetría embrionaria según criterios de ASEBIR fue casi perfecta (Gwet 0.91 (0.80-1.00)), sin embargo, esta concordancia para el concepto de EE tendió a ser inferior (Gwet 0.79 (0.62-0.95)). El porcentaje de acuerdo entre centros y expertos también tendió a ser superior al valorar asimetría (0.95 (0.89-1.00)) frente al obtenido al analizar EE (0.87 (0.78-0.96)). Al comparar Ppos y Pneg vemos que son similares para asimetría (0.96 vs 0.91) pero tienden a ser diferentes para EE (0.91 vs 0.74). El acuerdo en asimetría fue superior a 0.94 tanto si las blastómeras eran iguales como si no lo eran según los expertos. Sin embargo el acuerdo en EE fue de 0.92 (0.84-1.00) cuando los expertos decidieron que el embrión era EE y de 0.71 (0.45-0.98) cuando los expertos decidieron que el embrión era no EE.

CONCLUSIONES

Los centros presentan dificultad a la hora de detectar embriones no EE.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-38: ANÁLISIS MODAL DE FALLOS Y SUS EFECTOS EN LA FASE PRETÉCNICA DEL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA.

I Molina González (1), A Clavero Gilabert (2), M Gonzalvo López (2), M López Regalado (2), M Navarrete Carmona (2), H Gutierrez Rodriguez (2), M Canales Gijón (2), A Moral Fernández (2), P Navas Bastida (2), JA Castilla Alcalá (3)
(1) Hospital Universitario Río Hortega (HURH).Valladolid, (2) Unidad de Reproducción Humana. UGC Laboratorio Clínico y UGC Obstetricia y Ginecología, HU Virgen de las Nieves, Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (IBS), Granada, Spain., (3) Ceifer Biobanco, Granada.

INTRODUCCIÓN

En los procesos del laboratorio clínico, son en las fases extratécnicas (pre- y postécnica) donde suceden el mayor número de errores y los más críticos, por lo que existe la necesidad de establecer estrategias para su control. El análisis modal de fallos y sus efectos (AMFE) es un método para la gestión de fallos potenciales, e identificar sus consecuencias y proponer medidas para disminuirlos. En este trabajo se realiza un AMFE de la fase pretécnica del laboratorio de reproducción.

OBJETIVO

Detectar posibles fallos y sus efectos en la fase pretécnica del Laboratorio de Reproducción Asistida (LRA) y establecer acciones de mejora para disminuirlos.

MATERIAL Y MÉTODO

Un equipo multidisciplinar elaboró una relación de posibles fallos en las actividades de la fase pretécnica (solicitud, preparación del paciente, obtención, manipulación, identificación y transporte) y las posibles incidencias que se pueden producir a lo largo de ella para cada una de las áreas en que se divide el LRA (área de análisis, área de procesamiento de células y tejidos y área de crioconservación). Esta relación, fue valorada por 17 componentes de la Unidad de Reproducción para determinar la importancia que cada fallo tendría en la atención al paciente. Se utilizaron diferentes índices: gravedad, probabilidad de aparición, detección y de riesgo global (IPR) de cada uno de los posibles fallos. La magnitud del IPR muestra la prioridad con la que hay que valorar la incidencia, cuanto mayor sea el resultado, mayor es la necesidad de intervención.

RESULTADOS

Los posibles fallos con mayor IPR fueron, para el área de análisis que la petición sea ilegible, y la manipulación incorrecta en el uso de medios y/o técnicas. Para el área de procesamiento de células y tejidos, y el área de crioconservación los posibles fallos que obtuvieron mayor puntuación fue el error en la administración de fármacos y la solicitud a tiempo inadecuado y/ó incompletas. La mayor parte de los posibles fallos se asignaron a las actividades de obtención y manipulación de la muestra. A partir de estos resultados se establecieron una serie de acciones de mejora, se rediseñaron procesos y procedimientos para disminuir los IPR de estos posibles fallos y se decidieron tomar medidas: formación del personal en materia de seguridad, creación de un registro de incidencias, detallar funciones y responsabilidades de los diferentes profesionales implicados y la incorporación de un sistema de testigo (manual o automatizado). Además se definieron 12 indicadores de evaluación.

CONCLUSIONES

La elaboración de este estudio ha permitido detectar fallos latentes del sistema, que pueden llegar a hacerse inherentes a los procedimientos e influir en que se comentan errores, de aquí la importancia de continuar con la monitorización de los indicadores propuestos, para poder medir resultados a lo largo del tiempo y evaluar el efecto de las acciones desarrolladas.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CO-39: COMO AFECTAN LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES (COVS) AL RECUENTO DE ADN MITOCONDRIAL DE PRE-EMBRIONES HUMANOS.

D Beltran Torregrosa (1), V Vàsques Cubillos (1), C Rubio Iluesa (2), L Rodrigo Vivó (2), T Viloria Samochín (1), F Insua Piontti (1), A Díez Juan (2), MJ De los Santos Molina (1)
(1) IVI Valencia, Valencia, (2) Igenomix, Paterna, Valencia

INTRODUCCIÓN

Los COVs son sustancias que fácilmente se convierten en vapores o gases a temperatura ambiente pudiendo llegar a influir en la calidad del aire de los laboratorios de fecundación in vitro y por extensión perjudicar la calidad embrionaria. Asimismo, se ha establecido en modelos celulares que las mitocondrias pueden llegar a ser organelas diana de estos contaminantes ambientales. Los pre-embriones humanos en estadios tempranos y más tarde en estadio de blastocisto utilizan las mitocondrias de forma diferente para la producción de ATP uso que además va en paralelo a cambios morfológicos en la forma, la densidad de la matriz y el número de crestas. Se ha establecido que el ADN mitocondrial podría ser un marcador de estrés embrionario, de forma que un elevado contenido de ADN mitocondrial podría estar indicando un mayor estrés embrionario durante el cultivo.

OBJETIVO

Evaluar el efecto de los COVs sobre el recuento de ADN mitocondrial en los pre-embriones humanos a diferentes concentraciones.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio prospectivo de toxicidad dosis-respuesta que incluye un total de 163 embriones humanos donados a investigación en día 3 (D3) de desarrollo, con un número de células entre 6-10 y un porcentaje de fragmentación menor del 25%.

Un total de 150 embriones de D3 fueron cultivados en presencia de Benceno (B) y Limoneno (L), utilizando 3 dosis diferentes basadas en los niveles encontrados en el exterior (E), laboratorio (L) y doble laboratorio (D) así como 13 embriones fueron cultivados en medio control (c). Las concentraciones utilizadas en las mediciones de calidad del aire del laboratorio de fecundación in vitro fueron las siguientes para B y L: BE=268*10^-5ppm, BL=256*10^-5ppm, BDL=512*10^-5ppm; LE=87.5*10^-5ppm, LL=113.6*10^-5ppm y LD=226*10^-5ppm.

En aquellos embriones que llegaron al estadio de blastocisto en los que claramente se podía diferenciar la masa celular interna y el trofoectodermo y en los que se realizó biopsia de trofoectodermo (extrayendo de 4-6 células), se analizó el recuento de ADN mitocondrial mediante next generation sequencing (NGS) (n=106).

Para el análisis estadìtico se utilizó el test no paramétrico de Kruskal Wallis (p-valor<0.05).

RESULTADOS

La presencia de ambos contaminantes B y L en los medios de cultivos a diferentes concentraciones no parece llevar a ninguna diferencia en cuanto al recuento del ADN mitocondrial, con respecto al control (tabla 1)

Tabla 1: Efecto de los COVs sobre el recuento de ADN mitocondrial.

COVs	N	Mediana	Mín.	Máx.	Comparación
BD	18	20.61	13	66	NS
BE	19	16.68	13	44	NS
BL	17	20.85	13	45	NS
LD	11	22.29	13.89	38.38	NS
LE	16	20.29	14.44	43.31	NS
LL	14	20.33	16.2	49.32	NS
C	11	17.53	15	37	

CONCLUSIONES

No parece haber una relación entre los contaminantes en concentraciones de B y L y el número de recuento de ADN mitocondrial, pudiendo parecer que estos 2 contaminantes a estas concentraciones no afectan al recuento mitocondrial de embriones una vez que han llegado a blastocisto.

COMUNICACIONES
PÓSTER

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-001: VALIDACIÓN DE UN NUEVO ALGORITMO EN UN SISTEMA AUTOMÁTICO TIME-LAPSE

S. Pérez Albalá, B. Aparicio Ruiz, T. Viloria Samochín, J.M. de los Santos Molina, J. Remohí Gimenez, M. Meseguer Escrivá.
IVI Valencia, Valencia.

INTRODUCCIÓN

El primer algoritmo Eeva (Early Embryo Viability Assessment) desarrollado estaba basado únicamente en la combinación de dos parámetros calculados automáticamente por el sistema: P2=t3-t2 y P3=t4-t3. Este algoritmo ya fue propuesto por Wong et al (2010). Dicho algoritmo clasificaba los embriones según la probabilidad de alcanzar el estadío de blastocisto en embriones High ó Low. Posteriormente, se mejoró dicho algoritmo con una nueva versión en la que se incluyó una nueva categoría: Medium. Varios grupos han demostrado la utilidad de esta clasificación obteniéndose mejoras en la selección embrionaria y disminuyendo la variabilidad entre embriólogos (VerMilyea et al 2014, Conaghan et al 2013, Aparicio-Ruiz et al 2016). Actualmente, una versión nueva (Eeva Xtend) permite clasificar los embriones en 5 categorías según su capacidad de llegar a blastocisto.

OBJETIVO

Validar el nuevo algoritmo Eeva Xtend. Comprobar si existe una correlación entre la clasificación automática proporcionada por el sistema en D3 y la tasa y calidad de los blastocistos obtenidos. Ver si existe relación con el éxito reproductivo y la clasificación por morfología ASEBIR.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio retrospectivo en el que se incluyeron 97 pacientes del programa de ovodonación desde junio de 2016 hasta abril 2017. Un total de 961 embriones fueron cultivados en un incubador convencional con un sistema time lapse acoplado que incluye un software automático de análisis de imagen. Para la clasificación de los embriones se utilizó una nueva versión del algoritmo Eeva (Xtend). Este nuevo algoritmo incluye como parámetros los valores de P2 (t3-t2), P3 (t4-t3), edad ovocitaria, número de células en D3 y análisis de la textura (relacionado con la fragmentación). Este nuevo algoritmo clasifica los embriones del 1 al 5 según su probabilidad de alcanzar el estadío de blastocisto.

RESULTADOS

De los 961 embriones, 938 embriones fueron clasificados en 5 categorías, mientras que en 23 (2,4%) de ellos no se obtuvo ninguna categorización (NR): 1: 25,1% (n=241), 2: 17,4% (n=167), 3: 17,6% (n=169), 4: 20,3% (n=195), 5: 17,3% (n=166). El porcentaje de blastocistos (D5/6) obtenidos según categorías fue: 1: 89,6%, 2: 85%, 3: 77,5%, 4: 61%, 5: 40,5% ($p < 0.001$). El porcentaje de embriones viables (transferidos o congelados) (n=537) en cada categoría fue: 1: 75.5%, 2: 71.9%, 3: 61%, 4: 42.4%, 5: 25.2% ($p<0,001$). Al relacionar las categorías por morfología de ASEBIR con las categorías obtenidas por el sistema Eeva-Xtend encontramos que los embriones A y B son los que mayor porcentaje de embriones categorizados como 1 y 2 tienen: A (n=54) 1: 27 (50%); 2: 14 (26%); B (n=272) 1: 96 (35,3%); 2: 64 (23,5%). Para evaluar la tasa de implantación según la categoría de los embriones se analizaron sólo los casos de implantación conocida (100% ó 0%) (n=68). Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas: 1: 61.29% (n=31), 2: 46.15% (n=13), 3: 50% (n=12), 4: 50% (n=8), 5: 0% (n=4). ($p=0.239$).

CONCLUSIONES

Este estudio muestra los primeros resultados del nuevo algoritmo Eeva Xtend. Los resultados obtenidos muestran que existe una relación directa entre las categorías aportadas por el sistema y la tasa y la calidad de los blastocistos obtenidos. El hecho de que no se hayan obtenido diferencias significativas en cuanto a tasa de implantación podría deberse al tamaño de la muestra ya que sólo se incluyeron en dicho análisis los embriones de implantación conocida. No obstante, sí que se observa una tendencia a mayor tasa de implantación en los embriones categorizados como 1. Por tanto, dicho sistema time lapse podría ser utilizado como complemento de la valoración morfológica para una mejora en la selección embrionaria aumentando así el potencial reproductivo.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-002: LA FIV CONVENCIONAL MEJORA LOS RESULTADOS DE UN PROGRAMA DE OVODONACIÓN COMPARADO CON LA ICSI

J. Ten Morro (1), P. Peinado Alarcón (1), J. Guerrero Villena (1), A. Rodríguez Arnedo (1), L. Cascales Romero (2), J. Llácer Aparicio (1), R. Bernabéu Pérez (1).
(1) Instituto Bernabeu, Alicante, (2) Instituto Bernabeu, Madrid.

INTRODUCCIÓN

Utilizando ovocitos propios, un ensayo controlado aleatorio publicado en 2001 (Battacharya *et al.*) reveló que la FIV convencional se asoció con mejores tasas de fecundación e implantación. Sin embargo, el uso de la ICSI ha aumentado dramáticamente en los últimos años y no hay evidencia clara de sus beneficios en términos de resultados reproductivos. Recientemente, los pacientes de 40 años o más tampoco se beneficiaron de la ICSI en comparación con la FIV (Tannus *et al.*, 2017). En la mayoría de los programas de ovodonación, la microinyección se ha impuesto, incluso en pacientes sin factor masculino. No obstante, hay una completa falta de evidencia acerca de su posible ventaja.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio fue analizar los resultados de laboratorio y clínicos de nuestro programa de ovodonación en función de la técnica realizada (FIV convencional o ICSI) empleando muestras seminales normozoospérmicas.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio retrospectivo en el que se incluyó a 1.119 parejas que se sometieron a tratamientos de reproducción asistida empleando ovocitos de donante y transferencia de embriones frescos (TE) entre enero de 2012 y diciembre de 2015. A 506 parejas se les realizó una FIV convencional y a 613 una ICSI. Las receptoras tuvieron una cavidad uterina normal y un grosor endometrial ≥ 7 mm previo a la TE. Sus parejas masculinas tuvieron unos parámetros seminales normales según la Organización Mundial de la Salud (OMS, quinta edición). Los criterios de exclusión fueron: pacientes con fracaso repetido de implantación y/o aborto de repetición, uso de ovocitos congelados y empleo de muestras seminales de donante o espermatozoides congelados. Se evaluó la fecundación, la calidad embrionaria y los resultados clínicos. Hemos considerado los ciclos de ovodonación con TE, por lo que los casos con fallo total de fecundación no fueron incluidos en el estudio.

RESULTADOS

Las características basales (edades materna, paterna y de la donante, días de fase folicular, grosor endometrial, número de ovocitos inseminados / microinyectados y día de la transferencia embrionaria) fueron similares entre los dos grupos. Sólo el número de embriones transferidos fue significativamente mayor en el grupo de la ICSI en comparación con el de la FIV (1,7 vs 1,6, respectivamente, p = 0,0001) y este parámetro se utilizó como factor de confusión en el análisis de regresión logística. La tasa de fecundación no se vio afectada por la técnica empleada y alcanzó el 77% en los dos grupos. La FIV convencional aumentó significativamente el número de embriones de grado A en el día de la transferencia, el número total de blastocistos y el número de embriones criopreservados en comparación con la ICSI (1,75 vs 1,30, p = 0,0001; 4,95 vs 4,37, p=0,0001; 2,66 vs 2,19, p=0,0001, respectivamente). En cuanto a los resultados clínicos, la FIV convencional mostró un incremento en el embarazo clínico en comparación con la ICSI, pero sin significación estadística (54,9% vs 50,9%, p = 0,206). Sin embargo, la tasa de implantación aumentó significativamente cuando se realizó FIV en lugar de ICSI (43,6% vs 37,6%, p = 0,009). Finalmente, el aborto clínico fue similar en los dos grupos (14,2% tras FIV y 11,9% tras ICSI, p = 0,460). Tuvimos un 2,4% de fracaso total de fecundación tras FIV y 0,002% tras ICSI.

CONCLUSIONES

De acuerdo con nuestros resultados, debemos realizar FIV convencional en lugar de ICSI cuando tenemos muestras normozoospérmicas y ovocitos de donante. Debemos tener en cuenta que la FIV consume menos tiempo, es menos agresiva y que el logro de un mayor número de embriones criopreservados conducirá a un incremento en la tasa de embarazo acumulada a favor de la FIV.

BIBLIOGRAFÍA

Conventional in-vitro fertilisation versus intracytoplasmic sperm injection for the treatment of non-male-factor infertility: a randomised controlled trial.

Bhattacharya S, Hamilton MP, Shaaban M, Khalaf Y, Seddler M, Ghobara T, Braude P, Kennedy R, Rutherford A, Hartshorne G, Templeton A.

Lancet. 2001 Jun 30;357(9274):2075-9.

The role of intracytoplasmic sperm injection in non-male factor infertility in advanced maternal age.

Tannus S, Son WY, Gilman A, Younes G, Shavit T, Dahan MH.

Hum Reprod. 2017 Jan;32(1):119-124. Epub 2016 Nov 16.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-003: EL ÍNDICE DE MASA CORPORAL MATERNO AFECTA AL RECUENTO MITOCONDRIAL EN BLASTOCISTOS HUMANOS

C. Albert Rodríguez (1), M. Meseguer Escriva (1), G. Sevillano Almerich (1), A. Diez Juan (2), D. Beltran Torregrosa (1), M.J. de los Santos Molina (1)
(1) Instituto Valenciano de Infertilidad, Valencia, (2) Igenomix, Paterna, Valencia.

INTRODUCCIÓN

Las mitocondrias representan unos de los organelos más abundantes en los ovocitos humanos y su función resulta indispensable para mantener la viabilidad de los ovocitos y embriones puesto que intervienen en muchos procesos vitales tales como la homeostasis del calcio, producción de energía mediante al fosforilación oxidativa, síntesis de esteroides, y apoptosis entre otros. El número de mitocondria se instaura durante el establecimiento de la linea germinal y su número se incrementa de forma exponencial durante el crecimiento ovocitario. Se cree que se mantiene estable durante todo el crecimiento preimplantatorio aunque podría comenzar en estadio de blastocito. El número de mitocondrias presentes en los ovocitos puede variar dentro de una misma cohorte ovocitaria y esto podría repercutir en el total encontrado en los embriones. Algunas evidencias en animales sugieren la existencia de transmisión de señales de la obesidad a ovocitos y blastocitos

OBJETIVO

El objetivo de este estudio es evaluar que parámetros maternos y de estimulación ovárica influyen en contenido de ADN mitocondrial.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio retrospectivo de un total de 1886 blastocistos biopsiados procedentes de 421 ciclos de diagnóstico preimplantatorio comprendido entre junio de 2016 a enero de 2017). Las indicaciones del diagnóstico fueron las siguientes: edad maternal avanzada (n=265), fallo de implantación (n=51), factor masculino (n=32), aborto de repetición (n=36), embarazo previo con aneuploidías (n=6), enfermedad monogénica (n=22) otros (n=8).Variables independientes como edad de la mujer, Índice de masa corporal (IMC) , Índice de sensibilidad ovárica, días de estimulación, niveles de progesterona (P4) y estradiol (E2) el día de la administración de la hCG fueron analizados en relación con el recuento de ADN mitocondrial calculado mediante Next generation sequencing (NGS). El análisis estadístico se hizo mediante análisis multivariable, valores de $p< 0.05$ se consideraron con relevancia estadística

RESULTADOS

El análisis del contenido de ADN mitocondrial en los embriones mostraron tener una distribución no gaussiana con un curtosis de 17.17 + 0.17 y un mediana de 21.22 [11.50-199.16]. Tras la aplicación del modelo regresión mutivariable vimos que únicamente la P4 y el IMC están relacionado con el contenido mitocondrial de los embriones, de forma que por cada ng/ml que aumentaba la P4 la probabilidad de que el ADN mitocondrial estuviera por debajo de la mediana se multiplicaba 2.34 veces (1/0.427). Por otro lado por cada unidad que aumenta el IMC se multiplica por 1.063 la probabilidad de que el mitoscore estuviera por encima de la mediana. Adicionalmente la condición de anormalidad del embrión fue también analizada y observamos que la condición de anormalidad 1.74 la probabilidad de tener valores por encima de la mediana.

CONCLUSIONES

La relación entre el IMC y la predisposición a tener mayor recuento mitocondrial podría apoyar la teoría observada en animales de la transmisión de señales de la obesidad a ovocitos y blastocistos, de hecho en ratones obesos se ha visto una asociación entre obesidad y un mayor recuento mitocondrial lo que podría interpretarse como una prueba del efecto generacional, donde la condición de obesidad materna estaría estimulando mecanismos de biogénesis mitocondrial en los embriones como mecanismo compensatorio de la disfunción mitocondrial observada con la obesidad.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-004: LA HORA MALDITA (O EL DESTINO DE LOS EMBRIONES QUE BORRAN PRONÚCLEOS ANTES DE LAS 19H POST-ICSI)

M. Grossmann Camps, A. Rabanal Anglada, C. Selva Viñals, M. Colodrón Belío, C. Guix Galcerán, O. Serra Ortiz, R. Olivares Vela, L. Zamora Corzo.
Barcelona IVF, Barcelona.

INTRODUCCIÓN

Según las recomendaciones ASEBIR, la valoración de la fecundación de los embriones humanos debería realizarse entre las 16 y las 19h post-ICSI. En nuestro sistema de cultivo in vitro hasta D+5/D+6 en EmbryoScope detectamos un 6% de embriones que borran pronúcleos (PN) antes de las 19h, lo que es sorprendentemente alto y podría pasar desapercibido en una única valoración observacional realizada entre las 16h y las 19h post-ICSI.

OBJETIVO

Estudiamos el destino de aquellos embriones que borran pronúcleos antes de las 19h post ICSI comparado con aquellos en los que aparecen PN después de las 16h post-ICSI para ajustar el momento óptimo de valoración de la fecundación.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio retrospectivo de los embriones cultivados en sistema Time-lapse en el período Enero 2016 a Marzo 2017. Se analizaron embriones procedentes de ciclos "en fresco" tanto de FIV-ICSI (275) como de ciclos de DO-ICSI (225), cultivados en Embryoscope hasta D+5/D+6 en medios secuenciales Vitrolife G5 y ambiente de 6% de O2. De los 4711 embriones con fecundación normal (2PN) se valora el tiempo de aparición y desaparición de pronúcleos y el destino de esos embriones (transferido/vitrificado o desechado).

Se establecieron las siguientes franjas horarias objeto de estudio: entre 16 y 17h post-ICSI (FH1), 17 a 18h (FH2) y entre 18 y 19h (FH3). Analísis estadístico T de Student con P<0,005.

RESULTADOS

En nuestro sistema de cultivo in vitro hasta D+5/D+6 en EmbryoScope el tiempo medio de desaparición de PN es 24,1h aunque detectamos un 5,85% (276/4711) de embriones que borran PN antes de las 19h. La distribución de estos casos no se agrupa ni por origen de los ovocitos, ni por características seminales ni por edad de las pacientes de FIV.

La tasa de embrión que llega al estadio de blastocisto fue 71,7% en el grupo de FIV y del 77% en el grupo de DO.

FH1: 28 embriones borraron PN antes de las 17h y de ellos 9 alcanzó el estadio de blastocisto (significativamente menor que en los otros dos grupos). En este mismo intervalo, 24 embriones aún no habían presentado PN, de los cuales otros 9 llegaron al estadio de blastocisto.

FH2: 65 embriones borraron PN entre las 17 y las 18h post-ICSI y de ellos el 64,5% alcanzó el estadio de blastocisto, mientras que 21 embriones presentaron PN por primera vez durante esta franja de tiempo..

FH3: 179 embriones perdieron PN en esta franja horaria y de ellos casi el 70% alcanzó el estadio de blastocisto, mientras que sólo 13 embriones los mostraron por primera vez, y de éstos sólo 3 fueron vitrificados.

Con estos datos se establece que casi un 4% (179/4711) de las fecundaciones normales (2PN) pueden pasar desapercibidas si la valoración de la fecundación se realiza entre las 18 y las 19h post-ICSI, mientras que no se detectarían 3 embriones válidos.

No ha sido posible estudiar la implantación porque no hay transferencias únicas.

(nota: 4 embriones borraron PN antes de las 16h, dos de los cuales fueron vitrificados en estadio de blastocisto pero no se han considerado en este trabajo).

CONCLUSIONES

La correcta detección de los pronúcleos es un evento crucial en la valoración de los embriones humanos aptos para transferir/vitrificar. Aunque el intervalo recomendado para dicha detección va de las 16h a las 19h post-ICSI, aun siendo conscientes de que la cinética embrionaria varía según las condiciones de cultivo in vitro, planteamos ajustarla a 18h post-ICSI como máximo ya que en la última hora, en una única valoración observacional, podría pasar desapercibida hasta un 4% de la fecundación normal.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-005: IMPACTO DE LAS DIVISIONES ANÓMALAS EN LA TASA DE FORMACIÓN DE BLASTOCISTOS

M.I. Rey Daluz, M. Rodríguez Alonso, B. García García, A. Durán Boo, R. Devesa Hermida, F. López-Roibal Mourelle, S. Garcia Oro
Equipo Ron Hospital Quirón Coruña, A Coruña.

INTRODUCCIÓN

Tras la fecundación, cada célula del embrión se divide por mitosis en 2 células iguales. Sin embargo, se conoce la existencia de comportamientos anómalos durante las primeras divisiones embrionarias. La duración del ciclo celular es de unas 10-12 horas, lo que debería ser suficiente para que el embrión completase su división. Ciclos extremadamente cortos con una replicación incompleta de ADN podrían estar asociados con una distribución desigual del ADN entre las células hijas. La monitorización del desarrollo embrionario mediante un sistema de incubación time-lapse nos permite observar estas divisiones.

OBJETIVO

Evaluar, mediante un sistema de incubación time-lapse, las divisiones anómalas observadas en los embriones de nuestros pacientes, para determinar su prevalencia y su capacidad de desarrollo hasta el estadio de blastocisto.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio retrospectivo realizado en 83 pacientes (585 ovocitos MII) que se han sometido a un ciclo de ICSI en nuestro centro desde enero a marzo de 2017. Se incluyeron tanto los ciclos de donación de ovocitos (44 pacientes, 232 ovocitos MII) como los ciclos con ovocitos propios (39 pacientes, 353 ovocitos MII). En total se evaluaron las divisiones embrionarias de 467 ovocitos fecundados (192 propios, 275 de donante).

Los embriones se cultivaron en un medio único (1-Step, ORIGIO) hasta el quinto o sexto día de desarrollo, en el incubador Embryoscope (Vitrolife), al 6,1 % CO2 y 5% de O2. El análisis de las imágenes se realizó con el software del mismo equipo.

Identificamos diferentes patrones de división que consideramos anómalos (DA): división directa de 1 a 3 células o de 2 a 5 células, división de 1 célula a muchas células o fragmentos, intento de división fallida, reabsorción de células...

Se establecen tres grupos de estudio: pacientes con ovocitos de donante (I), pacientes con ovocitos propios menores de 40 años (II) y pacientes con ovocitos propios de edad mayor o igual a 40 años (III). En cada grupo se evalúa el porcentaje de embriones con división anómala y se compara la capacidad de desarrollo hasta el estadio de blastocisto entre los embriones con división anómala y división normal (DN).

La significación de los datos obtenidos se comprueba mediante un test Chi-cuadrado.

RESULTADOS

De los 585 MII incluidos en el estudio fecundaron 467 (79,8%) y 169 (36,2%) llegaron al estadio de blastocisto. De los 467 ovocitos fecundados, 126 embriones (26,9%) presentaron DA.

Los resultados observados se muestran a continuación (Tabla 1).

Tabla 1	OV.DON (I)	OV. PROP < 40 (II)	OV. PROP ≥ 40 (III)
Ovocitos MII	232	290	63
Ov. fecundados	192 (82,7%)	224 (77,2%)	51 (80,1%)
Blastocistos	78 (40,6%)	74 (33%)	17 (33,3%)
Embriones DA	21 (10,9%)	80 (35,7%)	25 (49%)

La tasa de fecundación y de formación de blastocisto observadas (grupos I, II, III) es igual (p>0,05).

El porcentaje de embriones anómalos entre cada grupo es significativamente diferente: I - II (p<0,05), I - III (p<0,05), II - III (p<0,05).

De los 126 embriones DA observados sólo uno llegó al estadio de blastocisto (0,8%). De los 341 embriones DN, 168 llegaron al estadio de blastocisto (49,2%).

La tasa de formación de blastocisto incluyendo todos los embriones (DA y DN) es de 36,2%. La tasa de formación de blastocisto de los embriones DN es de 49,2 % (p<0,05).

CONCLUSIONES

La prevalencia de los embriones que presentan división anómala aumenta con la edad de la mujer, lo que concuerda con la ya conocida relación entre la edad de la mujer y calidad embrionaria. Estos embriones tienen una baja capacidad de desarrollarse hasta el quinto/sexto día. Por tanto, consideramos que las primeras divisiones embrionarias pueden ser un factor de especial relevancia para predecir la formación de blastocistos. Además, estos resultados nos permiten utilizar en nuestro laboratorio el sistema de incubación time-lapse como método de selección embrionaria negativa.

BIBLIOGRAFÍA

Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsoe KM, Ramsing NB, Remohí J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. Human reproduction. 2011; 26(10): 2658-71.

Wirka KA, Chen AA, Conaghan J, Ivani K, Gvakharia M, Behr B, et al. Atypical embryo phenotypes identified by time-lapse microscopy: high prevalence and association with embryo development. Fertil Steril. 2014;101:1637-48.

Perelman R, Cohen C. Direct unequal cleavages: embryo developmental competence, genetic constitution and clinical outcome. Plos one, 2016; 11(12).

Neyer A, Zintz M, Stecher A, et al. The impact of paternal factors on cleavage stage and blastocyst development analyzed by time-lapse imaging -a retrospective observational study. J Assist Reprod Gent. 2015;32:1607-1614.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-006: EL RECUENTO DE ADN MITOCONDRIAL ESTÁ ASOCIADO CON LA CALIDAD DEL TROFOECTODERMO (TE) PERO NO SE ASOCIA CON LA CAPACIDAD DE IMPLANTACIÓN

A. Galán Rivas, A. Mifsud Giner, V. García-Laez Moreno, M.J. de los Santos Molina.
IVI Valencia, Valencia.

INTRODUCCIÓN

El recuento indirecto de ADN mitocondrial ha sido propuesto por varios grupos de investigación como un marcador no invasivo de viabilidad embrionaria y podría utilizarse de forma adicional para mejorar la selección de los embriones a transferir. Durante el desarrollo embrionario no hay biogénesis mitocondrial, sino que el número de mitocondrias se reparte entre los blastómeros a medida que el embrión crece. Es solo en el momento de las blastulación cuando podría empezar cierta actividad en la génesis de nuevas mitocondrias. Sin embargo, según los estudios retrospectivos, los blastocistos humanos con mayor recuento de ADN mitocondrial serían los menos viables ya que tal vez un incremento en la biogénesis del ADN mitocondrial estaría demostrando una respuesta exacerbada a la situación de estrés que agotaría la viabilidad del embrión.

Por otro lado, también es conocida que en humanos, no sólo la capacidad de implantación sino la de la obtener recién nacido está asociada a la calidad del TE, que necesita de la intervención de la mitocondrias para mantener la gran demanda de energía necesaria en los procesos de diferenciación celular y crecimiento.

OBJETIVO

Averiguar si la calidad de los TE podría estar correlacionada con el recuento de ADN mitocondrial.

MATERIAL Y MÉTODO

Se trata de un estudio retrospectivo de 1572 blastocistos biopsiados procedentes de 421 ciclos de diagnóstico preimplantatorio comprendido entre junio de 2016 a enero de 2017. Las indicaciones del diagnóstico fueron las siguientes: edad materna avanzada (n=265), fallo de implantación (n=51), factor masculino (n=32), aborto de repetición (n=36), embarazo previo con aneuploidía (n=6), enfermedad monogénica (n=22), otros (n=8). La calidad de los blastocistos se evaluó siguiendo los criterios de ASEBIR. Adicionalmente un total de 259 embriones se descongelaron y transfirieron. El recuento de ADN mitocondrial se comparó entre embriones que implantaron y embriones que no implantaron entre las diferentes categorías de blastocitos. Tests no paramétricos como el de Kruskall Wallis y test Chi-cuadrado fueron utilizados para comparar valores continuos y categóricos respectivamente, valores de $p< 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

La distribución de los embriones de las diferentes categorías fue: 2,48 % fueron evaluados como A, 53,18% fueron evaluados como B, 43,08% como C y 0,25% como D. Las media de edad materna según categoría de los embriones fue la siguiente: (A= 38,9 + 3,6, B= 38,7+ 4,2, C= 38,6 + 3,7 y D= 38,6 + 3,5). Los embriones con peor calidad de TE presentaron significativamente mayores valores de ADN mitocondrial. Los valores del recuento del ADN mitocondrial en cada categoría fueron: A= 19,02, B= 21,07, C= 21,43; y D= 31,5 ($p= 0,0459$). Tras comparar el recuento mitocondrial en las diferentes categorías de ASEBIR, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los embriones que implantaron y los que no.

CONCLUSIONES

La relación encontrada entre la inferior calidad de TE y mayor recuento mitocondrial puede ser debida a una biogénesis acelerada o sencillamente a la presencia de una mayor reparto de mitocondrias por célula. Desconocemos si la relación entre mitocondrias y calidad de los embriones es causa o efecto, de hecho es necesario realizar estudios que expliquen esta relación. Además, el hecho de que una vez estratificados por categorías no exista diferencia en el recuento mitocondrial pone en evidencia la necesidad de estudios prospectivos que demuestren su valor clínico.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-007: NUEVA TÉCNICA PARA DETECTAR MICRODELECIONES EN EL CROMOSOMA Y: REPERCUSIÓN CLÍNICA

E.M. García Hernández, B. Lledó Bosch, J.A. Ortiz Salcedo, R. Morales Sabater, A. Turienzo Díez, J. Llácer Aparicio, R. Bernabéu Pérez.
Instituto Bernabeu, Alicante.

INTRODUCCIÓN

Se ha observado que las variaciones en el número de copias (CNV) en la región AZF del cromosoma Y, están relacionadas con alteraciones en la espermatogénesis. Utilizar la técnica de MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification assay) para analizar estas CNVs, ofrece diversas ventajas respecto a otras técnicas como la PCR-Multiplex, ya que permite detectar microduplicaciones y deleciones parciales en las subregiones que conforman la región AZF.

Además, varios grupos de investigación han estudiado el efecto de estas CNVs en la región AZF sobre la espermatogénesis. Sugieren que, cuando se observan duplicaciones en esta región, éstas no se correlacionan significativamente con alteraciones en la espermatogénesis. Sin embargo, las implicaciones clínicas de las duplicaciones parciales están aún en controversia.

OBJETIVO

Validación de la técnica de MLPA para la detección de CNVs en la región AZF.

Estudiar si las variaciones en el número de copias en la región AZF detectadas mediante la técnica de MLPA, afectan al proceso de espermatogénesis.

MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó un estudio retrospectivo. Se incluyeron 197 pacientes con seminograma alterado (azoospérmicos, criptozoospérmicos y oligozoospérmicos). A estos pacientes se les había realizado previamente un estudio de microdeleciones utilizando la técnica de PCR-Multiplex, en el cual no se observó ninguna alteración en la región AZF. Como grupo control, se utilizaron 41 donantes de semen normozoospérmicos (según los criterios de la OMS, 2010).

El análisis de las posibles variaciones en el número de copias de la región AZF fue llevado a cabo, tanto en el grupo de pacientes como en el grupo control, mediante la técnica de MLPA (P360-B1 Y-Chromosome Microdeletions Probemix). Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el programa Coffalyser v1.4.

Para el análisis estadístico se utilizó chi-cuadrado (SPSS 20.0). El p-valor <0.05 fue considerado significativo.

RESULTADOS

Tras analizar los resultados observamos un 4.6% de microdeleciones en el grupo de pacientes. En el grupo control no se observó ninguna deleción (p=0.179), pero se detectaron duplicaciones en ambos grupos (14.6% control vs 7.6% pacientes). Por otro lado, el porcentaje de duplicaciones observadas en la región AZF fue mayor en el grupo control que en el grupo de pacientes (p=0.181). Se identificaron mediante la técnica de MLPA cinco tipos de CNVs. Concretamente, 2 tipos de deleciones (gr/gr, b1/b3) y 3 tipos de duplicaciones (gr/gr, b1/b3 y b2/b4). Respecto a las deleciones, solo se detectaron en el grupo de pacientes (3.6% gr/gr, 1% b1/b3), aunque estas diferencias no fueron significativas respecto al grupo control, debido al tamaño de las muestras.

En el caso de las duplicaciones gr/gr, no se observaron diferencias significativas entre el grupo control (4.9%) y el de pacientes (6.1%). Sin embargo, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de las duplicaciones b1/b3 (7.3%-1.5%; p=0.036) y b2/b4 (2.4%-0%; p=0.028) entre ambos grupos.

Para estudiar cómo afecta la presencia o ausencia de las CNVs sobre la espermatogénesis, analizamos la frecuencia de las duplicaciones y deleciones en el grupo de pacientes (azoospérmicos, criptozoospérmicos y oligozoospérmicos) respecto al grupo control. Los resultados mostraron que el mayor porcentaje de deleciones se encontraba en el grupo de azoospérmicos (p<0.05). Sin embargo, el porcentaje de deleciones fue similar (p>0.05) entre el grupo de criptozoospérmicos y oligozoospérmicos, respecto al grupo control.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren que la técnica de MLPA muestra mayor sensibilidad para detectar CNVs en la región AZF que la técnica de PCR-Multiplex. Por otro lado, la presencia de duplicaciones en dicha región podría ejercer un efecto protector en el proceso de espermatogénesis dado que su prevalencia es mayor en el grupo control.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-008: NUEVO BIOMARCADOR NO INVASIVO PARA LA SELECCIÓN EMBRIONARIA BASADO EN EL ESTADO OXIDATIVO DEL MEDIO DE CULTIVO

S. Arrones Olmo, L. Alegre, R. del Gallego, M.J. de los Santos, J. Remohi, M. Meseguer
IVI Instituto Valenciano de Infertilidad, Valencia.

INTRODUCCIÓN

Nuevas estrategias de análisis no invasivo, como la medición del potencial oxidativo del medio de cultivo, pueden proporcionar información relevante sobre la calidad de los embriones sin alterar las condiciones de cultivo embrionario. El desarrollo y validación de estas técnicas complementarias son imprescindibles para aumentar el éxito de los tratamientos de reproducción asistida.

OBJETIVO

Determinar si la actividad oxidativa del embrión y la oxidabilidad del medio de cultivo embrionario pueden ser considerados como marcadores del potencial de implantación.

MATERIAL Y MÉTODO

Análisis retrospectivo en el que se incluyeron 732 muestras de medio de cultivo embrionario, procedentes de incubadores time-lapse con estrategias de cultivo diferentes: individual (Embryoscope®) y en grupo (Geri® y Eeva®). Para el análisis oxidativo, se recogieron 15µl de medio de cultivo CCM (Vitrolife) de cada embrión en estadio de blastocisto. El TCL (termoquimioluminiscencia) basa su técnica en la inducción de la oxidación total de la muestra mediante energía térmica. De esta manera, provoca la formación de especies electrónicamente excitadas y, posteriormente, energía en forma de luz, detectada como fotones emitidos por segundo (**cps**). Los parámetros oxidativos considerados para el análisis fueron: **H1** (tras 55s), **H2** (155s) y **H3** (255s). Para normalizar los datos se aplicó un algoritmo de corrección (variable smoothing –**sm**) y se añadió el ruido de fondo propio de cada muestra (variable dark noise –**dn**). Los resultados obtenidos fueron analizados mediante tests Anova.

RESULTADOS

Diferencias estadísticamente significativas fueron halladas en 7 de las variables al comparar las estrategias de cultivo, individual o en grupo. Las más representativas (sig<0.001) fueron **H1dn-2dn-3dn** y **H1smdn-2smdn-3smdn**, obteniendo valores más elevados en las muestras Eeva® y Geri® de cultivo en grupo vs. cultivo individual en incubador Embryoscope®. Por otro lado, las muestras se dividieron en grupos según el destino de los embriones: transferidos (69%), vitrificados (15%), en observación (1%) o descartados (15%). Se encontraron diferencias significativas (sig<0.05) en 12 variables: **H1-2-3**; **H1sm-2sm-3sm**; **H1dn-2dn-3dn** y **H1smdn-2smdn-3smdn**; siendo los embriones transferidos y vitrificados los que presentaban valores más altos. A su vez, también se obtuvieron diferencias significativas (sig<0.05) en relación al potencial de implantación; ya que de los 205 embriones transferidos, el 54% que implantaron mostraron los valores más altos en 6 de las variables oxidativas (**H3sm**, **H1dn-2dn-3dn** y **H1smdn-2smdn**). Por tanto la actividad oxidativa, de manera generalizada, fue superior en los embriones cultivados en grupo, así como en los embriones transferidos y en aquellos que lograron implantar. Estos resultados indican que los embriones de buena calidad tienen un metabolismo oxidativo más activo, aumentando su carga oxidativa en el medio de cultivo que les rodea.

CONCLUSIONES

La técnica TCL es un método rápido y no invasivo que nos permite conocer el perfil oxidativo de los embriones, tanto de forma individual como en grupo. La correlación existente entre los parámetros oxidativos y el potencial de implantación abre una vía complementaria de selección embrionaria. Los resultados obtenidos en el presente estudio, en combinación con la morfología y morfocinética embrionaria, podrían suponer el desarrollo de un biomarcador clínico de calidad con aplicación previa a la transferencia.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-009: COMPARATIVA DE CRIOTRANSFERENCIAS DE BLASTOCISTOS EN FUNCIÓN DEL DÍA DE DESARROLLO EMBRIONARIO Y EL DÍA DE FASE LÚTEA ENDOMETRIAL

I. Iniesta Mirón, J.V. Martínez Sanchis, I. Peinado Casas, A. Martí Alemany, C. Díaz García, J.M. Rubio Rubio.
Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia.

INTRODUCCIÓN

Optimizar el cultivo de los embriones sobrantes tras la transferencia y/o vitrificación en día 3 hasta el estadio de blastocisto para su vitrificación y posterior criotransferencia puede aumentar la tasa de gestación por punción.

Está aceptado que los embriones vitrificados en día 5 son de mayor calidad y tiene mayor potencial de implantación que los vitrificados en día 6. Una de las posibles causas puede ser la transferencia de embriones en día 6 en un endometrio menos receptivo que en día 5 ya que la ventana de implantación no es la adecuada.

OBJETIVO

Estudiar si los embriones en día 6 tienen mayor tasa de gestación cuando se transfiere en un endometrio de fase lútea de día 5 que en un endometrio de fase lútea de día 6. Por otro lado comparar esta tasa de embriones de día 6 con la que tienen los blastocistos de día 5.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio retrospectivo y comparativo de 553 ciclos de transferencia de embriones congelados propios en estadio de blastocisto entre los años 2013 y 2016. Los blastocistos provenían de embriones subóptimos, que no tenían calidad para ser vitrificados o transferidos en día 3 y por tanto, se mantuvieron en cultivo hasta el estadio de blastocisto. Se establecieron 3 grupos de estudio:

Grupo I: Blastocistos de día 5 transferidos en un endometrio en fase lútea de día 5 (n=183).

Grupo II: Blastocistos de día 6 transferidos en un endometrio en fase lútea de día 5 (n=219).

Grupo III: Blastocistos de día 6 transferidos en un endometrio en fase lútea de día 6 (n=151).

Las variables que se compararon fueron: edad, tasa de supervivencia (TS), tasa de gestación (TG), tasa de aborto (TA).

RESULTADOS

La TG fue para el grupo I de 30,9%, para el grupo II de 32,1% y grupo III de 15,9% habiendo diferencias significativas (P=0,001).

La media de edad fue 34,72 años y no se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos de estudio.

Para el resto de variables (TS, TA) no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos.

CONCLUSIONES

Los blastocistos de día 6 provenientes de embriones subóptimos en día 3 transferidos en un endometrio en fase lútea de día 5 tienen un porcentaje de gestación similar a los blastocistos de día 5. Ambas tasas son muy superiores a la de los blastocistos en día 6 transferidos en un endometrio en fase lútea de día 6. De este modo, los blastocistos de día 6 tienen la misma capacidad de gestación que en día 5 siempre que sean transferidos en un endometrio de fase lútea de día 5. Por tanto, resulta más importante el día de fase lútea del endometrio que el día de desarrollo del embrión. Los blastocistos de día 5 que todavía no están haciendo hatching, pueden dejarse en cultivo hasta día 6 ya que no pierden capacidad de implantación.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-010: ¿MODIFICA EL DÍA DE LA TRANSFERENCIA EMBRIONARIA EL SEX RATIO?

I. Martínez Rodero, A. Genovés Pérez, S. Arrones Olmo, C. Olmedo Illueca, M. Barea Gómez, S. Royo Bolea, L. Abad de Velasco, A. Morales Vicente, I. Cuevas Saiz.
Hospital General Universitario de Valencia, Valencia.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han introducido muchos cambios en las condiciones de cultivo de los laboratorios (incubadores de sobremesa, filtración de volátiles, time lapse...) que están cambiando la tendencia del día de la transferencia embrionaria, cultivando cada vez más hasta estadio de blastocisto. El criterio de selección más extendido para la transferencia se basa en la morfología y el desarrollo del embrión y, según varios estudios, los embriones femeninos y masculinos presentan algunas diferencias en su comportamiento a partir de la activación del genoma embrionario. Puesto que los embriones XX tienen más material genético que los embriones XY, se desarrollarían de forma más lenta. Además, se ha visto que los blastocistos masculinos presentan más número de células. Por este motivo, la transferencia en blastocisto (día 5 o día 6 de cultivo) podría suponer una desviación del sex ratio a favor de los niños, ya que se seleccionarían para transferir con mayor frecuencia los blastocistos XY. Por el contrario, la transferencia en estadio de células (día 2 o día 3 de cultivo) no alteraría el sex ratio puesto que en ese momento, el genoma embrionario aún no estaría activado y los embriones de diferente sexo se comportarían por igual.

OBJETIVO

Evaluar el efecto de la transferencia embrionaria en distintos estadios de desarrollo sobre el sex ratio de la descendencia en nuestro centro.

MATERIAL Y MÉTODO

Se analizó retrospectivamente el sexo de los niños nacidos tras un tratamiento de fecundación in vitro en nuestro centro, tanto FIV convencional como ICSI, desde 2005 a 2016. Durante este periodo nacieron 280 bebés: 226 de ellos tras transferencia embrionaria en estadio de células y otros 54 tras transferencia en estadio de blastocisto. El análisis consistió en comparar el sexo de la descendencia obtenida tras transferencia en células y blastocisto. Se analizaron los datos mediante un test Chi-cuadrado usando el paquete SPSS Statistics versión 15.0.

RESULTADOS

El ratio niños/niñas en las transferencias en estadio de células fue 0.5/0.5, es decir; nacieron el mismo número de niños (113) que de niñas (113). Sin embargo, el ratio niños/niñas tras la transferencia en blastocisto fue 0.7/0.3, es decir, nacieron el doble de niños (36) que de niñas (18). Al comparar la proporción de niños y niñas nacidos por transferencia en d2/d3 frente a d5/d6, las diferencias resultaron estadísticamente significativas (p-valor<0.05).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio parecen apoyar que la transferencia en estadio de blastocisto favorece el nacimiento de niños, mientras que la transferencia en estadio de células mantiene la proporción natural (50% niños/50% niñas). A pesar de ello, el número de transferencias realizadas en blastocisto es muy inferior a las realizadas en células, por lo que es necesario aumentar la N en futuros estudios para la confirmación de esta hipótesis.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-011: RETRASOS EN LA CINÉTICA EMBRIONARIA: UN EFECTO DE LAS ROTURAS DE DOBLE CADENA EN EL ADN ESPERMÁTICO

A. Casanovas Fontanillas (1), J. Ribas Maynou (2), O. Hortal Codina (1), G. Pérez Diaz (1), A.R. Jiménez Macedo (1), J. Benet Català (3), J. Carrera Rotllan (1), A. García Peiró (4)
(1) Unitat Endocrinologia Ginecologica, Vic, Barcelona, (2) Centro de Infertilidad Masculina y Análisis de Barcelona (Cimab), Edifici Eureka, PBM5. Parc de Recerca de la UAB. Campus de la UAB. Bellaterra, Barcelona. (3) Departament de Biologia Cel-lular, Fisiologia i Immunologia. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra, Barcelona. (4) Centro de Infertilidad Masculina y Análisis de Barcelona (Cimab), Edifici Eureka, PBM5. Parc de Recerca de la UAB. Campus de la UAB. Bellaterra, Barcelona.

INTRODUCCIÓN

La metodología time-lapse permite una mayor caracterización del embrión a tiempo real durante las etapas del desarrollo embrionario preimplantacional. Su aplicación va dirigida al desarrollo de estrategias para seleccionar el embrión con mayor probabilidad de implantación tras ser transferido en el útero materno. Por otro lado, estudios previos en modelos animales han demostrado que la fragmentación de doble cadena del ADN espermático (dsSDF) induce la activación de mecanismos de control del ciclo celular. En este sentido, la contribución genética de un espermatozoide con roturas de doble cadena en su ADN podría tener consecuencias en el desarrollo embrionario humano.

OBJETIVO

El principal objetivo de este estudio es determinar el efecto de la fragmentación de cadena sencilla y doble sobre la cinética embrionaria determinada mediante tecnología time-lapse en ciclos de reproducción asistida mediante ICSI.

MATERIAL Y MÉTODO

Los datos se han obtenido de forma prospectiva y a doble ciego de 41 ciclos consecutivos de ICSI. Se han estudiado un total de 198 embriones que fueron monitorizados mediante time-lapse (Primo-vision, Vitrolife, Sweden). La fragmentación del ADN espermático se analizó mediante la técnica Comet, que permite distinguir entre roturas de cadena simple y de cadena doble. La muestra de semen analizada fue la misma que se utilizó para realizar la ICSI.

RESULTADOS

No se han observado diferencias de cinética embrionaria en ninguno de los estadios celulares analizados en relación a la fragmentación de cadena sencilla ($p>0,05$). Los embriones obtenidos a partir de espermatozoides con daño de doble cadena presentaron una cinética más lenta respeto a los embriones que provenían de muestras de semen con doble cadena normal. El efecto fue estadísticamente significativo en diferentes etapas ($p<0,05$), especialmente en la extrusión del 2º corpúsculo polar (11,6%) y en mórula (9,5%). En modelos animales en los que se ha inducido roturas de doble cadena del ADN espermático se han observado la activación de checkpoints de control en respuesta al daño de doble cadena, que podrían estar relacionados con los retrasos observados en estas etapas del desarrollo embrionario.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo muestran que las roturas de doble cadena en espermatozoides humanos causan una cinética embrionaria más lenta, mientras que este tipo de efecto no se observa asociado a las roturas de cadena sencilla.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-012: LA SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES CON ÁCIDO HIALURÓNICO (PICSI) AUMENTA LA TASA DE RECIÉN NACIDO VIVO EN LOS TRATAMIENTOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA.

L. Alegre Ferri, N. Garrido Puchalt, R. del Gallego Bonilla, M.J. de los Santos Molina, J. Remohí Giménez, M. Meseguer Escrivá
Instituto Valenciano de Infertilidad IVI, Valencia

INTRODUCCIÓN

El objetivo final de cualquier ciclo de FIV es lograr un recién nacido vivo en casa (RNV). En la mayoría de las técnicas enfocadas a mejorar el éxito de estos tratamientos se interviene a nivel ovocitario o embrionario. Sin embargo, se ha demostrado que con la técnica de selección espermática PICSI (physiologic intracytoplasmic sperm injection) se puede evitar la microinyección de espermatozoides inmaduros en el ovocito. La inmadurez espermática se ha asociado, entre otras cosas, a una mayor incidencia de embriones aneuploides.

OBJETIVO

Evaluar si el uso de la técnica PICSI aumenta la tasa de RNV y su posible efecto sobre el desarrollo embrionario (morfocinética embrionaria).

MATERIAL Y MÉTODO

Análisis intermedio de la tasa de recién nacido vivo. Estudio prospectivo, randomizado y triple-ciego. La técnica PICSI permite aislar los espermatozoides maduros de la muestra de semen por su capacidad de unión a ácido hialurónico (AH). El objetivo es incluir un total de 330 pacientes en el estudio. Hasta el momento se ha llevado a cabo el 80% del reclutamiento, contando con 260 parejas pertenecientes al programa de ovodonación: 125 en el grupo PICSI y 135 del grupo ICSI (Control). Obtuvimos resultados de 1394 embriones analizados, 742 del grupo PICSI y 652 de ICSI. Se utilizó un incubador time- lapse (Embryoscope) para el cultivo de los embriones en todos los casos.

RESULTADOS

Se observó una mayor tasa de RNV en los pacientes del grupo PICSI en comparación con el grupo ICSI, 69% y 64% respectivamente. Como en otros análisis anteriores, se observaron diferencias significativas con respecto a las variables morfocinéticas obtenidas entre el grupo PICSI y el control (sig <0.05). Así mismo, se comparó el desarrollo morfocinético de los embriones transferidos en ambos grupos y se obtuvieron diferencias entre los que dieron lugar a RNV y los no-RNV: t5 (52.62h vs. 50.61h), t6 (55.45h vs. 53.50h), t7 (58.70h vs. 56.67h).

CONCLUSIONES

Los resultados preliminares revelan una mayor tasa de RNV en embriones transferidos resultantes de la selección de espermatozoides con AH antes de la microinyección. Las diferencias encontradas en el desarrollo embrionario tras aplicar la técnica PICSI, también nos sugieren prestar una especial atención a los eventos morfocinéticos. El uso de esta técnica podría aumentar la tasa de recién nacido vivo, traduciéndose en un incremento del éxito de los tratamientos FIV, especialmente en los casos de infertilidad masculina.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-013: DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL (DGP): ¿BIOPSIA DE CÉLULAS O DE TROFOECTODERMO?

I. Torres González (1), N. Almunia Santiago (1), M. Valcarcel Andreu (1), A.M. Villaquirán Villalba (1), R. Jiménez Alfaro (1), A. Gómez Duró (2), E. Fernández García (2), E. Gómez Sánchez (1)
(1) TAHE FERTILIDAD, Murcia (2) Geniality Diagnóstico Genético, Madrid

INTRODUCCIÓN

El DGP es una técnica que permite la selección de embriones libres de anomalías cromosómicas o génicas. En los últimos años se ha propuesto un cambio fundamental en la metodología de la biopsia embrionaria, hacerla sobre el trofoectodermo del blastocisto en lugar de en una célula en día 3, evitando así una reducción en la tasa de implantación y detectando el mosaicismo.

OBJETIVO

El propósito del estudio fue analizar los resultados de nuestro programa de DGP comparando entre dos grupos de pacientes. En un grupo la biopsia se llevó a cabo el día 3 de desarrollo embrionario, y en el otro en blastocisto.

MATERIAL Y MÉTODO

Desde 2014 hasta 2016 se realizó DGP a 85 pacientes en nuestro Centro. En 47 ciclos la biopsia se hizo en día 3 de desarrollo embrionario y en 46 en blastocisto. Las edades de las mujeres (39,02 y 38,04) y de los varones (42,12 y 40,52) fueron similares en los 2 grupos. Lo mismo ocurrió con la concentración (44,79 y 42,86 mill/ ml) y la motilidad (39,32 y 43,93%) espermática.

Las causas por las que se realizó el estudio genético fueron:

El análisis genético de los embriones se hizo mediante array CGH o NGS. Los ciclos en los que la biopsia se realizó en blastocisto nunca tuvieron transferencia en fresco.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en los 93 ciclos de DGP fueron:

	DÍA 3	BLASTOCISTO
Edad	9	13
Abortos	1	1
Fallo Implantación	2	3
FISH Alterado	20	21
Cromosomopatía	4	3
Factor Masculino	2	
Embarazo Previo Aneuploidías	1	1
Deseo Paciente	6	3
Otros	2	1

(Ver tabla 1)

La tasa de implantación de los embriones biopsiados en estadio de blastocisto es un 10% mayor pero no alcanza la significancia. Lo mismo ocurre con las distintas tasas de gestación analizadas, siempre son mayores al biopsiar el trofoectodermo pero no son significativas.

CONCLUSIONES

Todos los valores comparados no presentan diferencias estadísticamente significativas, excepto el número de embriones biopsiados por ovocito fecundado que es más alto en día 3. Esto es lógico, ya que los embriones que alcanza el estadio de blastocisto son menos que los que llegan a día 3. El porcentaje de embriones diploides en día 5 es mayor aunque no de forma significativa.

A la luz de estos resultados no podemos afirmar categóricamente que la biopsia de trofoectodermo mejora los resultados de nuestro programa de DGP, aunque sí que hay una tendencia clara en este sentido. Por otro lado, al reducir el número de embriones biopsiados disminuye el costo para el paciente.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

	DÍA 3	BLASTOCISTO	
Embriones Biopsiados	265	237	
Porcentaje Fecundados Biopsiados	76,81%	51%	p
Embriones Euploides (%)	97 (36,6%)	100 (42,19%)	p>0,05
Embriones NO INFORMATIVOS (%)	19 (7,16%)	14 (5,9%)	p>0,05
Ciclos Todos Embriones Alterados (%)	8 (17,02%)	7 (15,22%)	p>0,05
Transferencias Fresco	34		
Embriones Transferidos Fresco	50 (1,47)	***	
Embriones Vitrificados	57	236	
Embarazos Transferencia Fresco (%)	16 (47,06%)	**	
Sacos Transferencia Fresco	18	**	
% Implantados Transferencia Fresco	18/50 (36,0%)	**	
Aborto Transferencia Fresco	1 (6,25%)	**	
Transfer Embriones Vitrificados	6	39	
Embriones Desvitrificados Transferidos	8 (1,33)	63 (1,62)	
Embarazos Embriones Vitrificados (%)	2 (33,33%)	21 (53,84%)	
Abortos Embriones Vitrificados (%)		2 (9,52%)	
Nº Sacos Embriones Vitrificados	2	28	
% Implantados Embriones Vitrificados	2/8 (25,0%)	28/63= 44,44	
Embarazos Totales Ciclo	18/47= 38,30 %	21/46= 45,65%	p>0,05
Embarazos Ciclo con Embriones Aptos	18/39= 46,15 %	21/39= 53,84%	p>0,05
% Implantados Total	20/58 = 34,48%	28/63= 44,44%	p>0,05
Embarazos Descontando los Abortos por Ciclo con Embriones Aptos	17/39= 43,58 %	19/39= 48,72%	p>0,05

Tabla 1

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-014: ALGORITMO DE MAXIMIZACIÓN DE LA INFORMATIVIDAD DE TAGSNPS Y SU APLICACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL.

N. Castejón Fernández, D. Amorós, S. González-Reig, H. Blanca, V. Penacho, A. López-Huedo, F. Galán, M.A. Fernández, L.A. Alcaraz
Bioarray SL., Elche, Alicante

INTRODUCCIÓN

Los estudios de genotipado usados en diagnóstico genético preimplantacional (DGP) tienen como objetivo identificar marcadores asociados a determinada enfermedad, pero suelen implicar el estudio de un elevado número de variables predictoras. Para solventar esto surgió el enfoque de los tagSNPs.

Un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) es una variación de la secuencia de ADN que afecta a una sola base. TagSNP es un SNP que representa a un conjunto de SNP de una región determinada, llamada haplotipo. Su uso reduce el coste de genotipado, permitiendo eliminar información redundante y simplificar la interpretación de los resultados. El objetivo fundamental de los algoritmos de cálculo de tagSNPs consiste en seleccionar un set mínimo y suficiente que represente los haplotipos sin repetir información.

Sin embargo, que un SNP sea "tag" no implica que sea útil en estudios de DGP donde un miembro de la pareja presenta cierta enfermedad, pues solo marcadores informativos (en heterocigosis en uno de los padres y homocigosis en el otro) permiten reconocer el cromosoma con el alelo enfermo y descartar embriones con la mutación. El requerimiento de marcadores ligados a la mutación se debe al llamado efecto ADO (allele drop-out) del alelo mutante durante el proceso de PCR; así, si el embrión no muestra la mutación debido a un ADO, pero sí los tagSNPs asociados, podrá ser descartado por un estudio indirecto.

Hasta ahora, este proceso de selección venía haciéndose por medio de algoritmos que no contemplaban la futura informatividad recogida por los tagSNPs escogidos, lo cual dejaba al azar el número de marcadores de utilidad a la hora de descartar embriones enfermos.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio consiste en el desarrollo de un nuevo algoritmo de cálculo de tagSNPs que maximice la informatividad, al mínimo coste, permitiendo el genotipado de un menor número de marcadores y su uso en estudios de informatividad para DGP.

MATERIAL Y MÉTODO

Hemos desarrollado un algoritmo basado en la combinación del "desequilibrio de ligamiento" (LD) y el coeficiente de correlación. Dos marcadores estarán en LD si no son heredados de forma independiente, de manera que uno (tagSNP) puede ser utilizado para inferir el estado alélico del otro.

Tras ello, el algoritmo se ha aplicado sobre estudios de simulación con los individuos europeos de la base de datos 1000Genomes [1] y estudios in vivo sobre parejas reales que habían solicitado DGP.

Además, los resultados obtenidos se han comparado con métodos previos de obtención de tagSNPs como el software DLtagSNP (2) y métodos basados en genotipado mediante microarray de SNPs.

RESULTADOS

Se observó que, además de seleccionar menor número de marcadores en cada región, nuestro algoritmo genera un set con mayor promedio y menor dispersión en la informatividad respecto a los otros métodos analizados, este hecho confirma que, mientras la informatividad era hasta ahora un hecho secundario suejeto al azar, nuestro algoritmo logra maximizarlo.

CONCLUSIONES

Este aumento de la informatividad, unido al aumento de restricción de los tagSNP, supone un ahorro en el coste de genotipado. Además, este hecho viene acompañado por un aumento del número de marcadores útiles en los estudios de informatividad que simplifica enormemente el posterior análisis de DGP.

Por tanto, nuestro trabajo permitiría modificar la visión actual del uso de tagSNPS, pues ya no es necesario obtener todos los marcadores para representar un genoma completo, sino tan solo los que maximicen la información aportada, evitando genotipar aquellos que aporten información redundante, no solo entre marcadores en un mismo genoma, sino entre individuos.

BIBLIOGRAFÍA

The 1000Genomes Project Consortium: A global Reference for human genetic variation. http://www.nature.com/nature/journal/v526/n7571/full/nature15393.html

Zongli Xu, Jack A., Taylor (2009). SNPinfo: Integrating GWAS and Candidate Gene Information into Functional SNP Selection for Genetic Association Studies. Nucleic Acids Research

https://support.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet_human_omni2.5.pdf

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-015: POLIMORFISMOS EN EL CARIOTIPO Y RIESGO INCREMENTADO DE ANEUPLOIDÍAS EN EMBRIONES PREIMPLANTACIONALES

E. García Guixé (1), E. Alsina Xiol (1), E. Toro Toro (1), M. Palahí Bages (1), E. Balius Fort (1), C. Giménez i Sevilla (1), E. Fernández García (2), J. Blanco Rodríguez (3), E. Antón Martorell (3), M. Sandalinas Alabert (1)
(1) Reprogenetics Spain, Barcelona, (2) Geniality Diagnóstico Genético. Madrid, (3) Genetics of Male Fertility Group, Unitat de Biologia Cel·lular (Facultat de Biociències), Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Spain.

INTRODUCCIÓN

Los polimorfismos en el cariotipo principalmente se refieren a: variaciones en la posición de la heterocromatina centromérica del cromosoma 9, variación en la longitud de la heterocromatina de los cromosomas 1, 9, 16, Y, o variación en la longitud del brazo corto y/o satélites de los cromosomas acrocéntricos. Estos polimorfismos son considerados una variante de la normalidad y no existe consenso entre los citogenetistas sobre si se deben informar o no al realizar un cariotipo. A pesar de no tener efectos fenotípicos parecen estar sobrerrepresentados en parejas infértiles. Se ha descrito una posible implicación de la heterocromatina en el apareamiento meiótico, la unión al huso cromático, el movimiento cromosómico y los eventos epigenéticos, pudiendo causar, entre otros, aneuploidía.

OBJETIVO

Nuestro objetivo es evaluar la posible correlación entre polimorfismos heterocromáticos en el cariotipo y un riesgo incrementado de aneuploidías en los embriones preimplantacionales de estas parejas.

MATERIAL Y MÉTODO

Se estudiaron retrospectivamente 101 muestras embrionarias provenientes de 14 ciclos de FIV-DGP-AS de parejas con el siguiente cariotipo: 46,XY,1qh+ (2 casos), 46,XY,13pss (2 casos), 46,XY,22ps+ (2 casos), 46,XY,9qh+ (3 casos), 46,XY,1qh+,9qh+, 46,XY,1qh+,21ps+, 46,XX,21ps+ (2 casos), 46,XY,21ps+. Los resultados fueron comparados estadísticamente mediante un Test de Chi-cuadrado con una significancia del 0.05 con un grupo de pacientes control (cariotipo normal, ovodonación y/o DGP-AS electivo): 82 muestras embrionarias provenientes de 13 ciclos de FIV-DGP-AS. La biopsia embrionaria en todos los casos se realizó en día+3 de desarrollo embrionario. Las muestras se analizaron mediante array de CGH (24sure, Illumina) excepto en 1 caso (4 muestras) que se analizaron mediante BoBs (Karyolite, Perkin Elmer).

Además, se realizó una prueba de FISH en espermatozoides en 5 hombres con el siguiente cariotipo: 46,XYq-, 46,XY,9qh+, 46,XYqh+, 46,XY,22ps+, 46,XY,13pss. Se analizó la frecuencia de nulisomías/disomías y diploidías de los siguientes cromosomas: X, Y, 1, 9, 13, 18, 21, 22 y los resultados se compararon estadísticamente con un grupo control mediante un Test de F de Fisher con un nivel de significancia estadística del 0.01.

RESULTADOS

En relación a los ciclos de FIV-DGP-AS, no se observan diferencias significativas en la media de edad materna del grupo de pacientes portadores de polimorfismos heterocromáticos respecto a la media del grupo control (30.8 vs. 30.8, $p< 0,9999$). Se observa un descenso significativo del número de embriones normales aptos para transferir en el grupo de pacientes portadores de un polimorfismo heterocromático respecto al grupo control (27.72% vs. 58.54%, $p<0.0001$).

En cuanto a la prueba de FISH en espermatozoides, en 3 de los 5 pacientes analizados se obtuvo un resultado de FISH alterado. En el caso 46,XY,9qh+ se encontró un incremento significativo de disomías para los cromosomas sexuales, en el caso 46,XY,22ps+ se encontraron disomías para el cromosoma 9 y nulisomías para los cromosomas 9 y 18, y en el caso 46,XY,13pss se encontró un incremento significativo de diploidías.

CONCLUSIONES

En este estudio, encontramos un incremento significativo de aneuploidías en embriones de pacientes portadores de variantes cromosómicas, concretamente de polimorfismos de heterocromatina y satélites. Este resultado puede explicar el elevado porcentaje de portadores de polimorfismos encontrados en la población infértil. Debe prestarse más atención a parejas infértiles con cariotipo revelando estas variantes cromosómicas. Cuando el hombre es el portador, debe valorarse la posibilidad de realizar una prueba de FISH en espermatozoides, para ver si la meiosis se está realizando correctamente en estos pacientes o tienen un riesgo incrementado de aneuploidías. En caso que la prueba de FISH saliera alterada, debe recomendarse la realización de un ciclo de FIV-DGP-AS. Cuando la portadora del polimorfismo heterocromático sea una mujer, puede considerarse la posibilidad de recomendar la realización de un ciclo de FIV-DGP-AS.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-016: MOSAICISMO CROMOSÓMICO EN BIOPSIAS EMBRIONARIAS. ESTADO DE LA CUESTIÓN

M. Sandalinas Alabert (1), M. Palahí Bagés (1), E. Balius Fort (1), D. Campos Rodero (1), E. García-Guixé (1), E. Alsina Xiol (1), M. de Acha Gual (1), P. Colls (2), C. Munné (2), C. Giménez Sevilla (1)
(1) Reprogenetics Spain, Barcelona, (2) Reprogenetics USA-Cooper Genomics

INTRODUCCIÓN

La detección de mosaicismo en las biopsias de trofoectodermo (TE) es un hallazgo común en el diagnóstico genético preimplantacional de aneuploidías (DGP-AS) mediante técnicas de secuenciación masiva (NGS). Se observa en aproximadamente en un 30% de los blastocistos analizados pero el desarrollo y destino los embriones diagnosticados como mosaico no está claro.

OBJETIVO

¿Qué tipos de mosaico observamos? ¿Con qué frecuencia? ¿Pueden estos embriones diagnosticados como mosaico implantar y dar lugar a embarazos evolutivos y a niños cromosómicamente normales?

MATERIAL Y MÉTODO

Se analizan 103,405 biopsias de TE en día 5, 6 y 7 de desarrollo de ciclos de DGP-AS mediante NGS (Veriseq, Illumina). Los resultados fueron compilados según edad materna. La clasificación de los embriones mosaico se basó en el tipo de mosaicismo (diploide-mosaico, aneuploide-mosaico, mosaico complejo), el número de cromosomas implicados (1,2 ó ≥3), el tipo de aneuploidía (total o parcial) y en el porcentaje de células anormales presentes en mosaico en la muestra analizada (<20%, 20-40%, 41-80%, >80%). Se estudió la frecuencia observada para cada tipo de mosaicismo establecido. Se transfirieron 143 embriones diagnosticados como mosaico y se evaluó la tasa de embarazo evolutivo según la clasificación descrita.

RESULTADOS

Se observó una frecuencia media de embriones mosaico del ~21.6%. La ocurrencia de mosaicismo no presentó relación con la edad materna. La frecuencia de embriones diploides-mosaico observada según porcentaje de mosaicismo fue la siguiente: <20%=3%, 20-40%=5.2%, 41-80%=4.8%, >80%=1.6%.

Respecto a los resultados clínicos, se observa que los embriones que presentan múltiples cromosomas afectados por aneuploidía en mosaico tienen significativamente menor tasa de implantación evolutiva (~6%) en comparación con otros tipos de mosaico. Los embriones mosaico de anomalía parcial (duplicación o deleción) muestran un potencial implantatorio cercano al observado en la transferencia de embriones euploides en este estudio (50-70%). En cuanto al porcentaje de mosaicismo, los embriones con 40-80% de mosaicismo presentaron una tasa de embarazo evolutivo del 22%, mientras que para aquellos con <40% de anomalías en mosaico la tasa observada fue del 56%.

CONCLUSIONES

La aplicación de la técnica de NGS permite detectar anomalías de mosaico difíciles o imposibles de identificar utilizando otros métodos (aCGH, qPCR, arrays de SNP). El mosaicismo cromosómico es un evento fisiológico que no guarda relación con la edad materna y es de origen mitótico. Nuestros resultados sugieren que la presencia de líneas celulares aneuploides en embriones puede comprometer el desarrollo embrionario. La viabilidad de estos embriones varía en función del tipo y extensión del mosaicismo. Si se detectan durante el tratamiento de FIV-DGP, los embriones mosaico no deberían ser necesariamente excluidos, pero sí deberían tener menor prioridad para la transferencia que los diagnosticados como euploides ya que las tasas de implantación evolutiva se reducen, aumenta el riesgo de aborto y a pesar de que hasta el momento no se ha producido ningún nacimiento de niño con anomalías, no se puede descartar ese riesgo. Los embarazos obtenidos tras la transferencia de un embrión mosaico deben someterse a pruebas prenatales para descartar la presencia de anomalías cromosómicas en el feto. Si bien se ha identificado alguna de las posibles causas del mosaicismo cromosómico en embriones preimplantacionales como, por ejemplo, el efecto de determinados tipos de cultivo, la manipulación excesiva de los embriones, etc., es necesario seguir investigando al respecto entre los diferentes subtipos de infertilidad e interrogar sobre los posibles efectos de procesos como la biopsia la amplificación y/o la estimulación ovárica, entre otros. Son necesarios más estudios para poder establecer las causas y diferencias descritas entre pacientes y/o centros y así determinar la incidencia y repercusión real de este fenómeno así como el posible riesgo, o no, de la transferencia de este tipo de embriones.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-017: DETECCIÓN DE LA BIOTINA ENDÓGENA COMO UN MÉTODO SIMPLE PARA EL MARCAJE DE LAS MITOCONDRIAS EN LOS ESPERMATOZOIDES

J.L. Girela López, M. Francou, A. de Juan Pérez, J. de Juan Herrero
Dpto. Biotecnologia. Universidad de Alicante, San Vicente del Raspeig, Alicante

INTRODUCCIÓN

La Estraptavidina es una proteína, obtenida de la bacteria Streptomyces avidinii, que presenta una extraordinaria afinidad por la biotina. Esta afinidad, una de las interacciones no covalentes más fuertes que se conoce, ha sido aprovechada en diferentes métodos de biología celular y molecular. En técnicas de inmunocitoquímica es habitual encontrar lectinas o anticuerpos conjugados con biotina, que son posteriormente reconocidos por una molécula de estreptavidina conjugada con un fluorocromo. La biotina, también conocida como vitamina B7, puede encontrarse de forma endógena en las células, al actuar como cofactor necesario para el correcto funcionamiento de ciertas enzimas, en particular de carboxylasas implicadas en el metabolismo energético. En los espermatozoides de diferentes especies, estas enzimas han sido identificadas en las mitocondrias, por lo que se estima una alta concentración de biotina en el interior de estos orgánulos.

OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo consiste en valorar la posibilidad de usar estreptavidina conjugada con fluorocromos para detectar la presencia de biotina endógena, principalmente localizada en las mitocondrias espermáticas. De esta forma se podría usar la estraptavidina como un método simple de detección de las mitocondrias en el espermatozoide.

MATERIAL Y MÉTODO

En este estudio se han utilizado espermatozoides de ratón y humanos, tras los correspondientes consentimientos informados y permisos éticos. Los espermatozoides de ratón fueron obtenidos del epidídimo tras el sacrificio de los animales para otras investigaciones, mientras que los humanos provienen de donantes sanos voluntarios. Una vez obtenidos los espermatozoides, tanto de ratón como humanos, estos fueron fijados en Paraformaldehido al 4% (EMS). Tras esto los espermatozoides fijados fueron depositados en un cubreojetos, secados al aire y procesados para técnicas de citoquímica. Los espermatozides fueron marcados con Estreptavidina conjugada con Isotiocianato de Fluoresceina (FITC) (SIGMA) y observados en un microscopio laser confocal Leica TCS-SP2 (LEICA). En algunos experimentos se realizó en paralelo un marcaje del axonema mediante una inmunofluorescencia indirecta, usando un anticuerpo primario anti-alfaTubulina producido en ratón (SIGMA), y un anticuerpo secundario conjugado con Cy3 (JACKSON).

RESULTADOS

Para un rango de dilución de 1:500 a 1:1000 se observó, en todos los espermatozoides estudiados, un claro marcaje en la pieza intermedia de los espermatozoides, correspondiente a la biotina endógena presente en las mitocondrias (Figura 1). No se observó ninguna señal en el resto del flagelo. Por su parte, en la cabeza de algunos espermatozoides se podía observar cierto marcaje, sugiriendo la presencia de biotina endógena en esta región. El marcaje permite reconocer la longitud de la pieza intermedia, encontrándose diferencias en las longitudes de esta entre ratón y humano, siendo más larga la pieza intermedia de los espermatozoides de ratón.

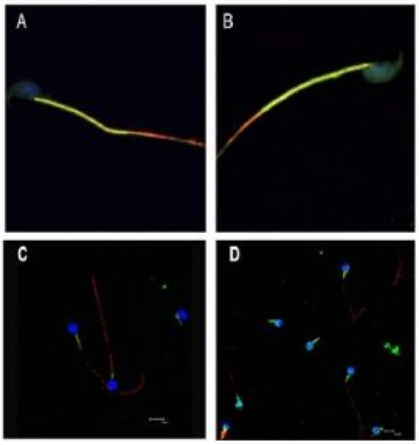


Figura1. Inmunomarcaje de biotina (verde), tubulina (rojo) y núcleos (azul) en espermatozoides de ratón /(A y B) y humanos (C y D).

CONCLUSIONES

Es posible detectar la biotina endógena mediante un marcaje sencillo y directo usando estreptavidina conjugada con un fluorocromo. Este marcaje permite la visualización de las mitocondrias espermáticas, por lo que puede ser de utilidad en aquellos estudios donde haya que identificar la región ocupada por las mismas. Por otro lado, el hecho de que exista un claro marcaje de la biotina endógena, desaconseja el uso de sistemas de citoquímica basados en el complejo biotina-avidina o biotina-estreptavidina en los estudios en espermatozoides humanos y de ratón. Esta interacción pone en entredicho cualquier resultado obtenido anteriormente con estos sistemas, al menos en lo que se refiere a la pieza intermedia, región ocupada por las mitocondrias.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-018: EL ANTIOXIDANTE NATURAL CINANTANINA B-1 PREVIENE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

A.M. Fabregat Reolid (1), M.D.R. Fernández Santos (2), E.M. García Hernández (1), J.J. Garde López Brea (2), B. Lledó Bosch (1), A. Turienzo Díez (1), A.J. Soler Valls (2), J.A. Ortiz Salcedo (1), R. Bernabeu Pérez (1)
(1) Instituto Bernabeu, Alicante, (2) Universidad de Castilla la Mancha, SaBio IREC CSIC - UCLM - JCCM / Faculty of Pharmacy UCLM

INTRODUCCIÓN

Tal y como varios estudios publicados demuestran, procesos como la capacidad de fertilización de los espermatozoides pueden verse alterados debido al estrés oxidativo a través del daño producido sobre las cadenas del ADN nuclear espermático así como también afectar al perfil epigenético de los mismos. Los antioxidantes podrían mejorar los medios usados para el procesamiento del semen, protegiendo a los espermatozoides de dicho daño en su ADN. La Cinantamina B-1 es una proantocianidina tipo A de origen natural que se encuentra en plantas como Linderae umbellateae, Laurus nobilis (laurel) y Cinnamomum verum (canela). Dichas plantas, además, muestran un gran número de propiedades a nivel celular, la mayoría de ellas derivadas de su capacidad antioxidante.

OBJETIVO

Evaluar si la Cinantanina B-1 presenta una acción protectora eficaz frente a la fragmentación del ADN espermático tras someter a los espermatozoides a un estrés oxidativo por incubación de los mismos a 37 ºC.

MATERIAL Y MÉTODO

Para conseguir nuestro objetivo, llevamos a cabo un estudio prospectivo. Se evaluaron noventa muestras procedentes de quince donantes incluidos en nuestro programa de donación de semen seleccionados según requerimientos del centro y de las guías ASRM y ESHRE para donación de gametos. Las muestras seminales fueron recogidas tras abstinencia sexual entre 48-72 horas y fueron incubadas a 37 ºC durante 4 horas con concentraciones de Cinantanina B-1 0, 10 y 100 µM. Tras la licuefacción de la muestra, lavamos el semen con PBS, ajustamos la concentración de espermatozoides a 20 M/ml y realizamos extensiones de cada una de las alícuotas. Debido a que la Cinantanina B-1 debía ser disuelta en etanol, la muestra control recibió también un volumen equivalente del mismo. La integridad del ADN fue medida a través del índice de fragmentación del ADN espermático (DFI) obtenido mediante el ensayo TUNEL (Terminal dUTP Nick-End Labeling). Este ensayo consiste en medir las roturas existentes en las cadenas de ADN incorporando en estos puntos de ruptura moléculas marcadas con un fluorocromo. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante SPSSv20.0 utilizando el test t-Student.

RESULTADOS

No se observaron diferencias significativas en el DFI al añadir un pequeño volumen de etanol a las muestras en fresco. Tras 4 horas de incubación a 37 ºC, obtuvimos un aumento significativo en el DFI en aquellas muestras de semen a las cuales no se había añadido antioxidante (10.27 vs 16.47; $p<0.05$) mostrándose así que la incubación a 37 ºC producía un daño en el ADN espermático. Sin embargo, en aquellas muestras que fueron incubadas con diferentes concentraciones de Cinantanina B-1 observamos una disminución significativa en el DFI (9.47±1.39) para 10 µM y (9.73±1.36) para 100 µM respecto a la muestra control (16.47±2.82)($p<0.05$). Estos resultados sugieren que la suplementación con Cinantanina B-1 puede prevenir el daño en el ADN espermático inducido por el estrés oxidativo. Además, los resultados también muestran que concentraciones de antioxidante superiores a 10 µM no aportan un mayor efecto protector.

CONCLUSIONES

La Cinantanina B-1 es capaz de ejercer una acción protectora desde el punto de vista de la fragmentación espermática ante un proceso inductor de estrés oxidativo como puede ser un aumento de temperatura mantenido en el tiempo. Un tema interesante podría ser la evaluación de este antioxidante como suplemento en los medios para criopreservación de espermatozoides con el fin de reducir el daño espermático durante el proceso de congelación. Dado el efecto beneficioso mostrado por la Cinantanina B-1 a nivel seminal, su uso también podría ser considerado como suplemento dietético especialmente en varones infértiles.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-020: EFECTO DE LA FRAGMENTACIÓN DEL DNA ESPERMÁTICO SOBRE LA CINÉTICA DE DIVISIÓN EMBRIONARIA

J. Sarquella Ventura (1), M. Hugas Mulà (1), M. Fernández Reig (1), L. Julià Andrés (1), E. Pinart Nadal (2)
(1) GIROFIV.CLÍNICA GIRONA, Girona, (2) Departament de Biologia. Universitat de Girona

INTRODUCCIÓN

Existen controversias sobre los efectos de la fragmentación del DNA espermático en la cinética de división temprana de los embriones en los ciclos de FIV/ICSI y, en definitiva, sobre los resultados reproductivos de las parejas infertiles. Estudios recientes correlacionan niveles altos de fragmentación en cadena sencilla (ssDNA) con una disminución de la tasa de fecundación y niveles altos de fragmentación de cadena doble (dsDNA) con fallos de implantación y aborto. Otros estudios indican que la técnica de selección espermática para los ciclos de FIV/ICSI elimina, en gran parte, los espermatozoides con daño en ssDNA pero no los espermatozoides con daño dsDNA.

OBJETIVOS

Analizar los efectos de la fragmentación del dsDNA espermático sobre la cinética de división de embriones humanos en ciclos de FIV/ICSI.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron 23 parejas de nuestro programa de FIV/ICSI, con un total de 25 ciclos: 20 con ovocitos de pacientes (PROPIOS) y 5 con ovocitos de donantes (OVODON). Para la estimulación ovárica, se utilizaron gonadotropinas de origen recombinante y análogos de la GnRH. Las pacientes se distribuyeron en dos grupos de edad: < 37 años (n=14) y ≥ 37 años (n=6); la media de edad de las donantes fue de 27,4 años (n=5). En todos los ciclos se utiliza semen de la pareja, previo análisis de la fragmentación dsDNA espermático mediante COMET. A partir de este análisis se establecieron dos grupos: dsDNA no fragmentado (< 60%; NoFrag) y dsDNA fragmentado (≥ 60%; Frg). Todos los ovocitos fueron fecundados mediante ICSI y cultivados a 37ºC, 6,5% CO2 y 7% 02, en medio único GLOBAL® y incubador time-lapse (TL) Embryoscope® hasta estadio de EB. Se analizaron 118 embriones, 81 procedentes de ovocitos de pacientes y 37 de ovocitos de donantes, y se valoraron los parámetros TL: tPB2, tPNa, tPNf, t2, t3, t4, t5, t6, t7, t8, M, SB, B, EB, ECC2, ECC3 y tPN. Los fotogramas se tomaron a intervalos de 20 minutos. El análisis de los parámetros TL en función del origen de los ovocitos, la edad de las pacientes y el grado de fragmentación dsDNA se realizó mediante el test de análisis de la varianza, con una significación p<0,05.

RESULTADOS

En los ciclos de OVODON, los embriones procedentes de muestras del grupo Frg presentaban una cinética significativamente más lenta que los embriones del grupo NoFrg (p<0,05) para los parámetros TL: M (92,37h±2,78h vs. 83,73h±2,42h), EB (108,73h±3,44h vs. 97,44h ±1,61h) y B (121,65h±4,85h vs. 103,06h±1,24h).

En los ciclos PROPIOS la cinética embrionaria no difirió de forma estadísticamente significativa entre los grups Frg y NoFrg para ninguno de los parámetros analizados (p≥0,05), probablemente debido a la heterogeneidad del grupo de pacientes. El estudio comparativo en función de la edad demostró que en las pacientes de <37años, la fragmentación dsDNA no alteraba la cinética embrionaria (p>0,05), mientras que en las pacientes de ≥37años inducia un retraso significativo en las primeras fases del desarrollo embrionario (p<0,05), que afectó a los parámetros TL: t3(39,41h±0,96h vs. 29,35h±6,05h), t6(54,79h±1,43h vs. 44,65h±0,25h), ECC2 (13,23h±0,30h vs. 9,80h±0,20h) y tPN (16,16h±0,57h vs. 10,50h±1,80h).

CONCLUSIONES

La fragmentación dsDNA espermático produce un enlentecimiento de la cinética de división embrionaria, aunque los parámetros TL alterados varían en función del origen de los ovocitos (pacientes-donantes), y la edad de las pacientes.

Es necesario ampliar los estudios aumentando el número de embriones y estableciendo grupos de pacientes en función de la indicación del tratamiento, para obtener unos resultados más robustos.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-021: PRESENCIA Y FUNCIÓN DEL RECEPTOR MU OPIOIDE DURANTE LA MADURACIÓN DE OVOCITOS: IMPORTANCIA EN LA FECUNDACIÓN Y EL DESARROLLO DE EMBRIONES EN RATÓN

E. Olabarrieta López, L. Totorikaguena Iturriaga, N. Agirregoitia Marcos, E. Agirregoitia Marcos.
Universidad del País Vasco, Leioa, Bizkaia

INTRODUCCIÓN

La maduración in vitro de ovocitos (MIV) consiste en la extracción de ovocitos inmaduros y posterior maduración exógena en medios de cultivo. Al no ser necesaria una alta estimulación hormonal de la paciente, se trata de una técnica idónea para evitar riesgos en determinados casos. Sin embargo, las tasas de gestación obtenidas no son lo suficientemente altas y por ello es necesaria la optimización de dicho procedimiento. Los ovocitos inmaduros se encuentran arrestados en la primera meiosis y no se da la reanudación meiótica hasta que no reciben señales específicas. Los péptidos opioides endógenos podrían ser unos de los candidatos a realizar dicha señalización, ya que dichos compuestos activan vías de señalización molecular similares a las que ocurren en el proceso de reanudación de la meiosis. Por tanto, la adición de opioides a medios de MIV podría ser una buena estrategia para mejorar este proceso y aumentar la tasa de maduración ovocitaria.

OBJETIVO

Evaluar la dinámica de expresión del receptor mu opioide (MOR) durante la maduración in vitro de ovocitos murinos y analizar los efectos que produce la adición de opioides durante la maduración in vitro de ovocitos en la señalización molecular, la tasa de maduración, fecundación y posterior desarrollo embrionario preimplantacional.

MATERIAL Y MÉTODO

Los complejos cúmulo-ovocitos (COC) inmaduros se obtuvieron de ovarios de ratonas. Se analizó la presencia de MOR en las células de la granulosa y en los ovocitos en cada una de las fases de maduración (vesícula germinal, GV; metafase I, MI; metafase II, MII) mediante QRT-PCR e inmunocitoquímica y se estudió la modulación de la vía de señalización de las MAPK (ERK 1/2) debida a la presencia del agonista opioide morfina en el medio de maduración. De igual manera, los COC se maduraron in vitro en ausencia y presencia de morfina a varias concentraciones (10-7 M, 10-8 y 10-9 M). Para analizar el efecto de la morfina en el posterior desarrollo embrionario, tras realizar la MIV se llevó a cabo la fecundación in vitro (FIV) y se observó el desarrollo hasta alcanzar el estadio de blastocisto analizando los porcentajes de fecundación y producción embrionaria.

RESULTADOS

Se observó la presencia del mRNA de MOR mediante QRT-PCR en células de la granulosa y en ovocitos. En estos últimos, el mRNA apareció en fase de GV, pero no en las fases más maduras del ovocito. La inmunocitoquímica también reveló la presencia de MOR en ovocitos en fase de GV y dicha proteína también se encontró expresada en las fases de MI y MII. De hecho, el receptor se relocalizó desde una posición más homogénea, en las fases más inmaduras, hacia la periferia del ovocito en la fase de MII. Al añadir morfina al medio de MIV, se observó que los ovocitos reanudaban antes la meiosis aunque, la tasa de maduración no aumentó con respecto al control. En cuanto al posterior desarrollo embrionario, se observó que la tasa de fecundación y producción embrionaria fueron mayores en aquellos ovocitos madurados en presencia de morfina con respecto al grupo control.

CONCLUSIONES

La presencia de MOR activo en los COC de ratonas y la modulación del proceso de maduración ovocitaria ejercida por compuestos opioides, tanto en los tiempos de maduración ovocitaria como en el desarrollo embrionario preimplantacional tras la FIV, abre nuevas perspectivas hacia la mejora de la técnica de maduración in vitro de ovocitos.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-022: IMPLICACIÓN DEL FITOCANNABINOIDE THC EN LA MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS DE RATÓN

L. Totorikaguena Iturriaga, E. Olabarrieta López, E. Agirregoitia Marcos, N. Agirregoitia Marcos
Euskal Herriko Unibertsitatea/ Universidad del Pais Vasco, Leioa, Bizkaia

INTRODUCCIÓN

Cada vez más parejas con problemas de esterilidad acuden a las clínicas de reproducción asistida, pero el éxito en la fecundación no llega a ser total. Un proceso poco estudiado es el de la maduración in vitro de ovocitos (MIV). Esta técnica consiste en la extracción de ovocitos inmaduros y su posterior maduración exógena en medios de cultivo. Al no ser necesaria una alta estimulación hormonal de la paciente resulta idónea para evitar riesgos en determinados casos. Sin embargo, las tasas de gestación obtenidas no son suficientemente altas y por ello es necesaria la optimización de dicho procedimiento. Se ha descrito la presencia del sistema cannabinoide en ovocitos murinos y, como las vías metabólicas que activan los compuestos cannabinoides son las mismas que se deben activar para que se reanude la maduración, parece interesante investigar el uso de dichos compuestos en los medios de cultivo para evaluar su implicación en el proceso de IVM.

OBJETIVO

Analizar las funciones del sistema cannabinoide en el proceso de maduración de ovocitos murinos y la repercusión en la fecundación y posterior desarrollo embrionario; para confirmar su participación, y más exactamente comprobar la participación del fitocannabinoide THC en la modulación del proceso de maduración de los ovocitos y su efecto en el posterior desarrollo embrionario.

MATERIAL Y MÉTODO

Se extrajeron los complejos cúmulo-ovocitos inmaduros de ovarios de ratonas wild type y de ratones transgénicos knockout para el receptor CB1 y/o CB2 y se maduraron in vitro en ausencia y presencia del fitocannabinoide THC a la concentración de 10-6 M, 10-7 y 10-8 M para observar el tiempo de maduración. Para analizar el efecto del fitocannabinoide THC en el posterior desarrollo embrionario, tras realizar la MIV en presencia de THC a la concentración de 10-7 M, se llevó a cabo la fecundación in vitro (FIV) con espermatozoides procedentes de ratones wild type. Se observó el desarrollo hasta alcanzar el estadio de blastocisto y se analizaron los porcentajes de fecundación y producción embrionaria. De igual manera, se analizó la modulación de la vía de señalización de las MAPK (ERK 1/2) debida a la presencia del agonista cannabinoide THC en el medio de maduración. Por último, se realizó una observación histológica del número de ovocitos presentes en el ovario de ratones con los diferentes genotipos para los receptores cannabinoides utilizados en la experimentación.

RESULTADOS

Se observó mediante inmunocitoquímica que la expresión y la dinámica del receptor cannabinoide CB1 en la maduración de ovocitos murinos cambia en ausencia o presencia del fitocannabinoide THC y que al añadir THC al medio MIV, los ovocitos reanudaban antes la meiosis, aunque la tasa de maduración no aumenta con respecto al control. En cuanto al posterior desarrollo embrionario, se observó que la tasa de fecundación y producción embrionaria eran mayores en aquellos ovocitos madurados con THC con respecto al grupo control. El THC también modula la vía de las MAPK. Por último, la ausencia de los receptores cannabinoides merma la presencia de ovocitos en el ratón en comparación con los ratones wild type.

CONCLUSIONES

La modulación del sistema cannabinoide genera una acción importante en el proceso de maduración ovocitaria, en la fecundación y posterior desarrollo embrionario. De hecho, el efecto que muestra el THC añadido al medio de maduración en la duración de la MIV y en el posterior desarrollo del embrión, abre nuevas expectativas hacia una mejora de la técnica de maduración in vitro de ovocitos.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-023: ANÁLISIS DE DIFERENTES ABORDAJES EN LA REALIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL. BIOPSIA EN D3 VS D5. TRANSFERENCIA EN FRESCO VS DIFERIDA

F. Rodríguez Juárez, E. Padilla, J. Rayward, L. López Yáñez
Procreatec, Madrid

INTRODUCCIÓN

El Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) es una técnica enfocada a la selección de los embriones con una correcta dotación cromosómica y/o genética y que mejore las tasas de embarazo, disminuyendo a su vez los abortos. Existen diferentes procedimientos a la hora de realizar esta técnica: por una parte, se pueden utilizar diferentes técnicas de biopsia para obtener el material a analizar. Por otra parte, existen diferentes técnicas de análisis del material genético, que pueden modificar el resultado del análisis.

OBJETIVO

Los objetivos de este trabajo son:

- Evaluar si existe diferencia en la tasa de implantación embrionaria en ciclos de DGP, realizando la biopsia en día 3 (D3) o día 5 (D5) con la misma técnica de biopsia (láser).
- Evaluar si existe diferencia en la tasa de implantación embrionaria en ciclos de DGP, realizando la transferencia en ciclo en fresco o en ciclo diferido.

MATERIAL Y MÉTODO

Se estudió un total de 42 ciclos de ICSI con DGP comprendidos entre julio de 2014 y diciembre de 2016 en la clínica. La edad media de las donantes de ovocitos fue de 25,4 años, y de ciclos propios 39,5 años.

Todas las biopsias se realizaron mediante la utilización de láser (Saturn 5; Research Instruments). El análisis de las muestras se realizó en Reprogenetics Spain.

Se realizaron 4 grupos en función del día de la biopsia embrionaria y del momento de la transferencia. El grupo 1 corresponde a los embriones biopsiados en D3 y transferidos en fresco en blastocisto D5; el grupo 2 corresponde a los biopsiados en D3, vitrificados en D5 y transferidos en diferido; el grupo 3 corresponde a los biopsiados en D5 y transferidos en fresco en D6; el grupo 4 corresponde a los biopsiados en D5, vitrificados en D5 y transferidos en diferido. Dentro de cada grupo, se evaluaron la tasa de embarazo bioquímico, la tasa de implantación, y la tasa de aborto.

Para comprobar si existen diferencias significativas entre los grupos estudiados, se realizó un test de Fisher.

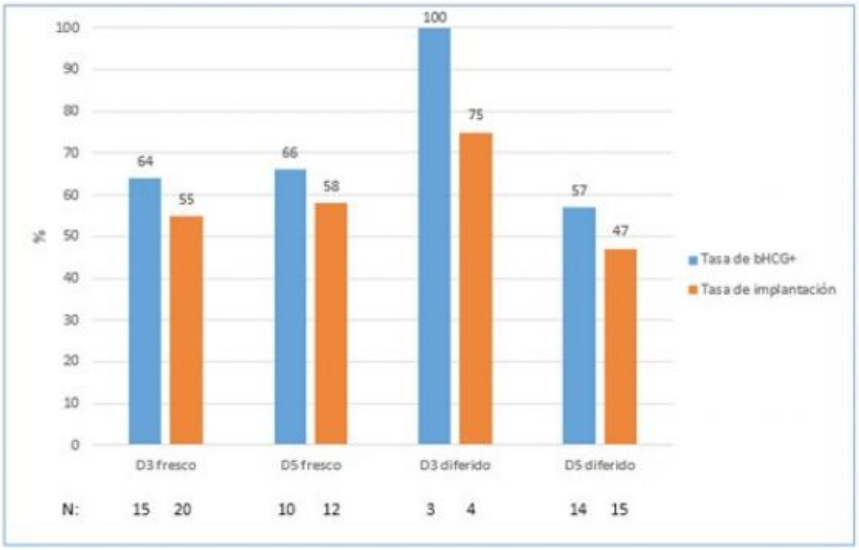


Figura 1

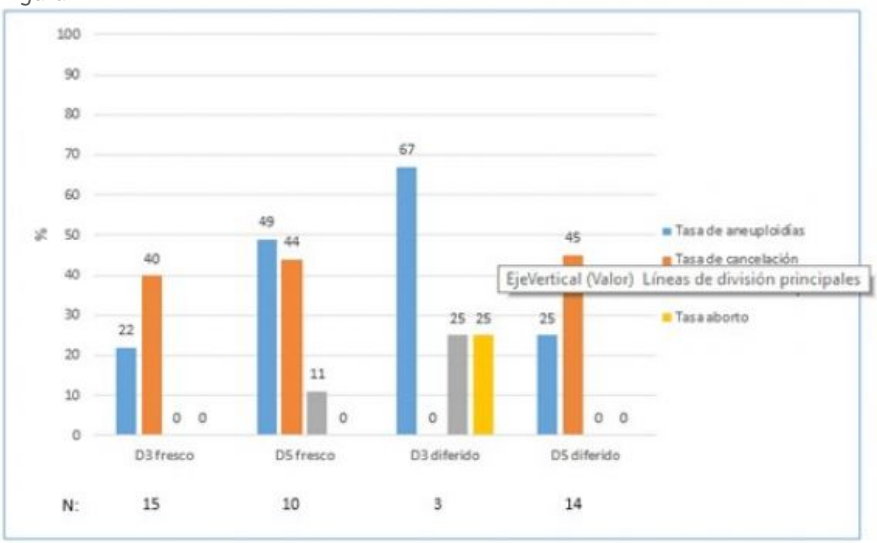


Figura 2

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

RESULTADOS

Se analizaron la tasa de embarazos bioquímicos (HCG+) y la tasa de implantación en los cuatro grupos, no encontrándose diferencias (Figura 1). También se evaluaron la tasa de embriones aneuploides por tratamiento, la tasa de ciclos en las que el 100% de los embriones analizados fueron aneuploides (tasa de cancelación), la tasa de embarazo bioquímico y la tasa de aborto (Figura 2). En ninguno de los parámetros estudiados se encontraron diferencias significativas.

CONCLUSIONES

Podemos concluir que ambos métodos de biopsia (D3 vs D5) y ambas estrategias de transferencia (fresco vs diferido) son adecuadas a la hora de realizar un DGP, y se debe elegir en función de las necesidades del paciente y de las posibilidades del centro.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-024: DETERMINACIÓN DE PLOIDÍAS EN ESPERMATOZOIDES MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO Y SU EFECTO EN LOS RESULTADOS REPRODUCTIVOS

R. Lafuente Varea (1), K. Lattes (1), D. García García (2), R. Vassena (1), D. Mataró Marsal (1), M. Brassesco Macazzaga (1)
(1) CIRH, Barcelona, (2) Clínica EUGIN, Barcelona

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de técnicas citogenéticas como la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) ha permitido analizar la presencia de aneuploidías teniendo en cuenta los cromosomas más relevantes. Numerosos estudios han confirmado una correlación inversa entre las tasas de aneuploidía en espermatozoides y los parámetros seminales convencionales, por lo que la presencia de aneuploidías en espermatozoides aparece frecuentemente en pacientes que presentan fallos en la espermatogénesis, relacionándose con oligospermia o azoospermia.

A parte del FISH, el estudio de ploidías se puede realizar de manera rápida y sensible mediante citometría de flujo, analizándose una media de 100.000 espermatozoides en cada determinación. Esta técnica permite obtener información cuantitativa y cualitativa de las células espermáticas, y determinar subpoblaciones con diferentes contenidos de ADN y, por tanto, con diferentes niveles de ploidías. Esta metodología analiza un mayor número de células que en un FISH convencional y tiene en cuenta a todo el contenido de ADN de la célula.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio es estudiar mediante citometría de flujo la relación entre el nivel de ploidías en la población de espermatozoides de cada paciente y el resultado del embarazo tras un tratamiento de fecundación *in vitro* (FIV).

MATERIAL Y MÉTODO

Este es un estudio de cohortes retrospectivo, donde se ha considerado el primer ciclo (primera transferencia) de un total de 481 parejas que se han sometido a un ciclo de FIV. Estos pacientes realizaron un seminograma y un estudio del ADN espermático usando una tinción con ioduro de propidio (PI/RNasa, BD Pharmingen) mediante citometría de flujo (MACSQuant Analyzer, Miltenyi Biotec). Las poblaciones espermáticas se clasificaron según la intensidad de fluorescencia como: subhaploides, haploides, diploides y poliploides. Se ha realizado un análisis univariable en el que se han comparado los diferentes resultados obtenidos del seminograma y del estudio de ploidías en función de los resultados reproductivos (positivo/negativo): embarazo clínico, embarazo evolutivo y niño nacido. El análisis estadístico se ha realizado mediante pruebas t-test de Student, considerando como estadísticamente significativo valores de $p<0,05$.

RESULTADOS

No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros seminales convencionales entre los pacientes con resultados reproductivos positivos y negativos.

No se observan diferencias significativas en los niveles de subhaploidías entre los pacientes con resultados reproductivos positivos y negativos para embarazo clínico (35.0% *vs*. 65.0%, p=0.77), embarazo evolutivo (22.5% *vs*. 77.5%, p=0.79), o con niño nacido (22.2% *vs*. 77.8%, p=0.83). Tampoco se observan diferencias en la tasa de haploidías (35.0% *vs*. 65.0%, p=0.45 embarazo clínico; 22.5% *vs*. 77.5%, p=0.21 embarazo evolutivo; 22.2% *vs*. 77.8%, p=0.25 niño nacido); ni en la tasa de diploidías (35.0% *vs*. 65.0%, p=0.42 embarazo clínico; 22.5% *vs*. 77.5%, p=0.29 embarazo evolutivo; 22.2% *vs*. 77.8%, p=0.32, niño nacido). Sin embrago, en el porcentaje de poliploidías sí se detectan diferencias estadísticamente significativas excepto para embarazo bioquímico (35.0% vs. 65.0%, p=0.21; 22.5% *vs*. 77.5%, p=0.01; 22.2% *vs*. 77.8%, p=0.02, respectivamente), observándose una media del porcentaje de poliploidías algo mayor en el grupo de pacientes embarazadas, pero sin relevancia clínica.

CONCLUSIONES

En nuestro grupo de pacientes en tratamiento de FIV la determinación de los diferentes niveles de ploidías no se relaciona directamente con el resultado del embarazo, por lo que a priori, no es un análisis que debiera incluirse de rutina a cualquier paciente antes de someterse a una FIV.

Sin embargo, dado que la citometría de flujo permite un estudio de todos los cromosomas de manera rápida y con un coste inferior al FISH, es una herramienta que puede ser empleada y es recomendable en pacientes con alteraciones seminales o con sospecha de riesgo genético.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-025: TASAS DE EMBARAZO SEGÚN EL NÚMERO DE OVOCITOS DE DONANTE ASIGNADO A LA RECEPTORA

J.A. Sánchez Rodríguez, E. Criado Scholz
FIVMARBELLA, Marbella, Málaga

INTRODUCCIÓN

Los avances en las técnicas de reproducción asistida cada vez nos permiten obtener mejores resultados y conseguir mejores tasas de gestación. Estos avances, también conllevan algunos problemas que hoy presentan difícil solución, como es el elevado número de embriones vitrificados cada año, ya que muchos de ellos no serán nunca usados debido a que la paciente consigue embarazo con una transferencia en fresco o en una criotransferencia, quedando aún más embriones criopreservados.

Como personal sanitario, debemos ofrecer a nuestros pacientes las máximas garantías de conseguir un embarazo sin incurrir en un almacenamiento masivo de embriones que pocas veces van a tener un uso.

OBJETIVO

Obtener un rango de ovocitos óptimos para asignar a las receptoras de ovocitos, que nos permita ofrecerles una garantía de conseguir embarazo sin la necesidad de crear muchos más embriones de los que puedan necesitar a la largo de su vida reproductiva.

MATERIAL Y MÉTODO

Se estudian un total de 188 ciclos de ovodonación, entre 2015 y primer trimestre de 2017, dividiendo a las receptoras en tres grupos diferentes según el número de ovocitos asignado. Grupo 1(G1)- de 2 a 5 ovocitos (n=20), Grupo 2(G2)- de 6 a 8 ovocitos (n=80) y Grupo 3(G3)-de 9 a 16 ovocitos (n=88).

En todos los casos, el semen es de pareja, y están excluidos los ciclos con DGP.

RESULTADOS

Al analizar los resultados respecto a número medio de embriones transferidos la diferencia entre los tres grupos apenas es apreciable (G1: 1,18; G2: 1,41; G3: 1,52). Esta diferencia si es notable en el número de embriones vitrificados (G1: 1,00; G2: 1,66; G3: 2,17).

Además, se analiza en cada grupo el número de ciclos en los que sólo se realiza transferencia en fresco (G1: 20,00%; G2: 22,50%; G3: 16,00%), transferencia en fresco más vitrificación de embriones (G1: 35,00%; G2: 56,25%; G3: 68,20%), vitrificación de embriones sin transferencia en fresco (G1: 25,00%; G2: 21,25%; G3: 13,60%) y por último, ciclos sin embriones para transferir ni vitrificar (G1: 20,00%; G2: 0,00%; G3: 2,20%).

En el porcentaje de transferencias realizados por grupo observamos dos tendencias, una que contiene al G1 (55%) y otra que contiene al G2 (78,75) y G3 (85,22). Respecto a las tasas de embarazo (B-HCG), encontramos los siguientes valores en cada grupo; G1: 54,54%; G2: 58,73%; G3: 62,66%. Esta tasa de embarazo no contempla posteriores criotransferencias.

CONCLUSIONES

Al analizar los resultados obtenidos, observamos que no existe una diferencia entre el número medio de embriones transferidos en ninguno de los 3 grupos, esta diferencia, si se observa en el número de embriones vitrificados, que aumenta conforme aumenta el número de ovocitos asignados a la receptora.

Al valorar si la paciente recibió transferencia, vitrifico embriones, ambas o ninguno de los dos, observamos que en los 3 grupos la mayoría de las pacientes tienen una transferencia en fresco y además llegan a vitrificar embriones, en mayor número según aumente el número de ovocitos asignados. Resalta el alto porcentaje que alcanzan en G1 los ciclos sin transferencia ni vitrificación de embriones.

Respecto a porcentaje de transferencias realizadas por ciclo, existe un salto cuantitativo entre el G1 y G2-G3, pero esta diferencia es menos acusada en la tasa de gestación tras transferencia.

Con los resultados obtenidos, podemos afirmar que las pacientes de G2 y G3 tienen prácticamente las mismas opciones de conseguir embarazo con una transferencia en fresco, criopreservando un menor número de embriones, en el caso de G2.

Se necesitaría realizar más estudios, y aumentar el número de casos con receptoras con menos de 5 ovocitos, para comprobar si esa tendencia es real o se debe a la baja casusística que presenta en nuestro estudio.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-026: IMPORTANCIA DEL SCREENING DE ANEUPLOIDÍAS PARA LA OPTIMIZACIÓN DE RESULTADOS EN CICLOS DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL PARA ENFERMEDADES HEREDITARIAS (DGP-SGD)

E. Toro Toro, L. Álvarez Gómez, E. Balius Fort, E. Alsina Xiol, M. Palahí Bages, A. Alcalá San Martin, D. Campos Rodero, E. Garcia Guixé, M. Sandalinas Alabert, C. Giménez Sevilla
Reprogenetics Spain, Barcelona

INTRODUCCIÓN

Históricamente, los pacientes portadores de enfermedades hereditarias que se someten a técnicas de reproducción asistida para la selección de embriones no afectos se han considerado como un grupo de buen pronóstico. Pese a ello, la tasa de embarazo que se observa en este grupo se sitúa entre las más bajas de entre todas las indicaciones de DGP.

La presencia de aneuploidías, habitual en embriones humanos preimplantacionales *in vitro,* afecta negativamente al éxito en técnicas de reproducción asistida. Por ello, la optimización de resultados en ciclos de DGP-SGD implica, no solo una elevada fiabilidad en el diagnóstico de embriones sanos, sino también la selección de embriones euploides.

OBJETIVO

Evaluar el efecto de la aneuploidía en función de la edad materna en ciclos de DGP-SGD y determinar el número de embriones mínimo necesario a analizar para maximizar las opciones de conseguir un embrión sano y euploide de acuerdo con la edad de la paciente.

MATERIAL Y MÉTODO

Se incluyen en el estudio embriones procedentes de ciclos de DGP-SGD con análisis de aneuploidías ya sea con biopsia en D+3 o en blastocisto. Se realiza una amplificación total del genoma a las muestras obtenidas y posteriormente se siguen dos vías de análisis: 1)diagnóstico de la enfermedad hereditaria mediante PCR convencional o *Karyomapping* (Illumina); y 2)estudio de aneuploidías mediante aCGH (24Sure,Illumina) o técnicas de secuenciación masiva (NGS,Veriseq,Illumina) de los embriones sanos para la enfermedad monogénica.

Se evalúa la incidencia de aneuploidías en los embriones sanos en función de la edad de las pacientes.

RESULTADOS

Se incluyen 45 ciclos de DGP-SGD con estudio de aneuploidías (286 embriones). De ellos, 36 se analizan mediante PCR y aCGH y el resto (n=9), mediante *Karyomapping* y NGS. Se estudian 27 patologías distintas que engloban enfermedades de herencia autosómica dominante (55,5%), recesiva (11,1%) y también síndromes ligados al cromosoma X (33,3%). La media de edad materna fue de 34.7 años.

Se establecen los siguientes grupos según la edad materna: <35 años (n=19), 35-39 años (n=21) y ≥40 años (n=5). La media de embriones biopsiados es de 6,7 en las pacientes más jóvenes, 5,9 en el grupo de pacientes de 35-39 años y 5,5 embriones en el grupo de mayor edad. No se observan diferencias en el promedio de embriones analizados en día+3 con el de blastocistos dentro de cada grupo de edad.

La tasa global de embriones sanos observada teniendo en cuenta solamente la enfermedad hereditaria fue del 52,3% mientras que la de embriones sanos y diagnosticados como euploides fue del 19,5%. Según el grupo de edad, estos porcentajes fueron respectivamente del 46,6% y 22,9% para las pacientes <35 años, del 56,8% y 20,1% para el comprendido entre 35-39 años, y del 58,6% y 3,4% para las ≥40 años.

Desde el punto de vista del análisis genético, en el grupo de <35 años será necesario mínimo 4 embriones biopsiables para poder disponer de un embrión sano y euploide. En el grupo de 35-39 años se recomienda aproximadamente un número mínimo de 5 embriones para conseguir un embrión no afecto y euploide. Las pacientes de ≥40 años presentan peor pronóstico.

CONCLUSIONES

Según nuestros resultados, el grupo <35 años tiene más posibilidades de obtener un embrión sano para la enfermedad estudiada y euploide. La capacidad de implantación de un embrión diagnosticado como euploide es independiente de la edad materna por lo que en pacientes ≥40 años se recomienda acumular embriones para así aumentar las posibilidades de transferencia y éxito en el tratamiento. Este estudio pone de manifiesto la importancia del screening de aneuploidías en ciclos de DGP-SGD para optimizar las tasas de embarazo y ayuda a ofrecer un mejor asesoramiento a las parejas portadoras de enfermedades hereditarias.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-027: ALTERACIONES CROMOSÓMICAS ESTRUCTURALES: VALIDACIÓN DE LA TECNOLOGÍA NEXT GENERATION SEQUENCING PARA SU APLICACIÓN AL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL

A. Gómez Duro, L. Carretero Vilarroig, E. Fernández García
Geniality Diagnóstico Genético, Madrid

INTRODUCCIÓN

Las alteraciones cromosómicas estructurales representan una de las indicaciones más frecuentes (15%) para el Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP). Los efectos fenotípicos de los cambios estructurales dependerán de su tamaño y ubicación, y de si hay ganancia o pérdida del material genético. Algunos cambios pueden tener consecuencias sobre la salud y el desarrollo del individuo, mientras que otros no tienen ningún efecto sobre la salud. Los pacientes portadores de estas alteraciones estructurales en equilibrio pueden presentan problemas reproductivos, esterilidad, fallos de implantación y abortos espontáneos.

El array-CGH se introduce en el DGP de alteraciones estructurales permitiendo el análisis de todo el complemento cromosómico del embrión. Recientemente, la secuenciación masiva (NGS) ha impulsado e incrementado el interés de esta tecnología en el campo de la genética reproductiva. La gran diferencia con respecto al array-CGH radica en que la técnica del NGS junto con la biopsia de trofoectodermo (día+5), nos permite por primera vez detectar con fiabilidad la presencia de mosaicismo, cuando éste está presente en al menos el 20% de las células biopsiadas, mejorando la selección de embrión Euploide.

OBJETIVO

Validación de la tecnología NGS como método de DGP de alteraciones cromosómicas estructurales mediante el análisis de embriones de pacientes con translocaciones que previamente fueron estudiados mediante la tecnología de aCGH.

MATERIAL Y MÉTODO

Se seleccionaron un total de 20 muestras amplificadas mediante Whole Genome Amplification (Sureplex) de embriones correspondientes a 13 casos de DGPs (11 reordenamientos). Las muestras procedían de embriones biopsiados en día+3 (10) y día+5 (10) de cultivo embrionario, diagnosticados previamente mediante aCGH (24 sure+ y 24sureV3). Se llevó a cabo el protocolo Veriseq-PGS de Illumina, y secuenciación en sistema MiSeq. El análisis de los resultados se realizó mediante el software de análisis BlueFuse Multi 4.3.

RESULTADOS

Se analizaron 480 cromosomas, para NGS 443 fueron euploides (92,3%) y 37 (7,7%) presentaba algún tipo de aneuploidia o eran desequilibrados. Una de las muestras de trofoectodermo mostró ganancia del cromosoma 18 y pérdida del cromosoma 9 en mosaico no detectadas mediante aCGH. La especificidad analítica (cromosoma aneuploide) fue del 99,6% (95% IC 98,4% - 99,9%), siendo la sensibilidad analítica del 100% (95% IC 90,1% - 100%). En el análisis de los cromosomas sexuales hubo un 100% de concordancia. En las 20 muestras analizadas se obtuvo un diagnóstico clínico (trasferible/ no transferible) igual al obtenido previamente mediante aCGH. Tanto la sensibilidad como la especificidad clínica fueron del 100%. Los valores predictivos positivo y negativo para el análisis de alteraciones cromosómicas estructurales basado en el protocolo de NGS fue del 100%. El tamaño mínimo detectado en uno de los cromosomas desequilibrados fue de 4Mb.

CONCLUSIONES

El NGS nos permite la secuenciación simultánea de múltiples muestras, gracias al uso de "DNA barcoding", es una técnica robusta, de alto rendimiento y lista para su aplicación clínica en el campo de la genética reproductiva. Los resultados obtenidos demuestran la capacidad del NGS, para el análisis de alteraciones cromosómicas estructurales en el DGP, tanto en blastómero como en muestras de trofoectodermo. Además del análisis del reordenamiento y el screening de todo el componente cromosómico, el NGS proporciona la detección de embriones mosaico en el análisis de Trofoectodermo.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-028: EVALUACIÓN DE UNA NUEVA VÍA DE ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS EN LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA QUE MINIMIZA EL NÚMERO DE INYECCIONES

J. Guerrero Villena, J. Ten Morro, A. Rodríguez Arnedo, R. Bernabeu Pérez
Instituto Bernabeu, Alicante

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con un estudio en el que se evaluaba las principales causas generadoras de estrés en las pacientes que se someten a tratamientos de fertilidad, el 23% de las pacientes señalaba el uso de fármacos inyectables para la estimulación ovárica como una de las cuestiones que les preocupaba de manera importante, comparable al 28% que manifestaban su preocupación por tener que someterse a una anestesia (Franco et al.,2002). De hecho, se estima que aproximadamente un 10% de la población adulta padece miedo patológico a las inyecciones o belonefobia (Nir et al, 2003).

OBJETIVO

Nuestro objetivo es comparar la tolerabilidad a la estimulación con inyecciones estándar frente al uso del dispositivo i-Port Advance®.

MATERIAL Y MÉTODO

El dispositivo se emplea de manera rutinaria en pacientes diabéticos insulinodependientes y consiste en una cánula flexible que permanece en el tejido subcutáneo a través de la que se puede administrar la medicación evitando la punción con la aguja. De acuerdo con la ficha técnica del dispositivo, éste debe reemplazarse por uno nuevo cada tres días. Se trata de un estudio prospectivo cruzado en el que se incluyen 16 pacientes que se asignaron aleatoriamente al grupo de tratamiento con inyección convencional o con dispositivo i-Port®, y tras un período de tres meses pasaron a la otra rama de tratamiento, por lo que cada paciente actuó como su propio control. Las dosis y protocolos utilizados fueron los habituales para donantes de ovocitos. Se comparó la tolerancia del tratamiento mediante la aplicación de un cuestionario, así como la aparición de reacciones adversas.

RESULTADOS

En relación a las molestias al administrar la medicación, en una escala del 1 al 10 (de menos a más molesto), las pacientes refirieron una media de 5,6 ± 3,3 con inyecciones convencionales y 1,9 ± 2,0 con iPort®, siendo estadísticamente significativo (p = 0,02). A la pregunta de que preferirían en un próximo tratamiento todas ellas eligieron el dispositivo. De igual manera, en todos los casos lo recomendarían a conocidos o familiares en el hipotético caso de que tuvieran que someterse a una estimulación ovárica. Respecto a las reacciones adversas en un caso se reportó la aparición de hematomas al emplear inyecciones. No se observaron diferencias en la duración de la estimulación (9,3 ± 1,2 días vs 9,0± 1,3; p = 0,53), con inyecciones convencionales y dispositivo respectivamente. El consumo medio de gonadotropina en el grupo de inyecciones fue 2126,3 ± 383,6 UI, mientras que el grupo iPort® necesitó 2101,9 ± 364,4 UI para completar el tratamiento (p = 0,43). El número de ovocitos recuperados fue de 16,5 ± 7,2 con inyecciones convencionales frente a 17,2 ± 7,4 en los donantes tratados con iPort ® (p = 0,16). Teniendo en cuenta todos los fármacos administrados, se necesitaron 12,5 ± 3,2 inyecciones en la estimulación convencional mientras que en el grupo iPort® fueron reemplazados por la aplicación de 3,3 ± 1,2 dispositivos.

CONCLUSIONES

El empleo del dispositivo i-Port Advance® ofrece una mejor experiencia para las donantes de ovocitos que las inyecciones subcutáneas. Su uso sería extensible a cualquier paciente en tratamientos de fertilidad y además, se podría plantear su uso para la aplicación de otros fármacos empleados habitualmente en fertilidad como la progesterona subcutánea para el apoyo de la fase lútea o tratamientos coadyuvantes como la heparina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Franco JG Jr, Razera Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Felipe V, Garbellini E. Psychological evaluation test after the use of assisted reproduction techniques. J Assist Reprod Genet. 2002 Jun; 19:274-8.

2. Nir Y, Paz A, Sabo E, Potasman I. Fear of injections in young adults: prevalence and associations. Am J Trop Med Hyg. 2003;68(3):341-4.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-029: EL ESTUDIO DE LA RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL MEDIANTE ER MAP® MEJORA SIGNIFICATIVAMENTE LOS RESULTADOS DE LOS TRATAMIENTOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN PACIENTES CON FALLO REPETIDO DE IMPLANTACIÓN

J. Sarasa Marcuello (1), J. Aizpurua (2), I. Jurado (1), B. Rodríguez Estrada (1), M.C. García Poyo (1), A.B. Climent (2), P. Martínez Ortiz (2), M. Enciso (1)
(1) iGLS, Alicante, (2) IVF-Spain Alicante

INTRODUCCIÓN

El endometrio es una estructura activa que experimenta cambios durante el ciclo menstrual, alcanzando un estado receptivo para la implantación embrionaria alrededor del día 19-21. Varios estudios han demostrado variaciones en el perfil de expresión génica del endometrio en distintos momentos del ciclo, en respuesta a distintos protocolos de estimulación ovárica, condiciones y/o patologías endometriales. El perfil de receptividad endometrial durante la ventana de implantación (VI) y su firma transcriptómica puede usarse para evaluar la función endometrial. ER Map® es una nueva herramienta de diagnóstico capaz de predecir con exactitud el estado de receptividad analizando el perfil de expresión génica del endometrio mediante PCR cuantitativa (RT-qPCR). Esta prueba permite detectar aquellos endometrios con alteraciones en la receptividad endometrial, identificar la VI y personalizar la transferencia embrionaria.

OBJETIVO

El objetivo del estudio es determinar si la identificación de la VI mediante la prueba ER Map® y la programación personalizada de la transferencia embrionaria en el momento de mayor receptividad endometrial mejora los resultados de los tratamientos de reproducción asistida.

MATERIAL Y MÉTODO

Este estudio retrospectivo incluye 233 mujeres con 2 o más ciclos fallidos de FIV previos sometidas a tratamiento de donación de óvulos entre marzo del 2016 y abril del 2017. En todos los casos se determinó la VI mediante ER Map®. Para ello se obtuvo una muestra de biopsia endometrial en un ciclo hormonal sustituido en P4 + 5,5. Las muestras se procesaron siguiendo el protocolo ER Map® y se clasificaron en tres estados: Receptivo, Pre-receptivo o Post-receptivo. En los casos en los que el endometrio se clasificó como Receptivo, se recomendó la transferencia embrionaria en el mismo momento y tipo de ciclo en que se realizó la biopsia. En los casos en que se detectó un desplazamiento de VI, se realizó una segunda biopsia para confirmar este desplazamiento y se recomendó la transferencia en el momento de mayor receptividad endometrial.

Finalmente, se compararon las tasas de embarazo de pacientes cuando la transferencia de embriones se programó en el momento de mayor receptividad endometrial según lo recomendado por ER Map® (grupo A) o de acuerdo con la evaluación endometrial estándar y desviándose más de 12h de la recomendación ER Map® (grupo B).

RESULTADOS

Un total de 68 de las 233 pacientes estudiadas presentaron una VI desplazada (29,18%). Dentro de este grupo de pacientes, se logró una tasa de embarazo significativamente superior en aquellas transferencias de embriones que se habían realizado siguiendo la recomendación ER Map® comparada con las transferencias que siguieron los métodos de evaluación endometrial tradicionales y se desviaron más de 12h de la recomendación (71,7% vs. 41,1% Prueba X2, p <0,01). La aplicación de ER Map® en estos casos permitió casi duplicar las tasas de embarazo de estos pacientes.

En el caso de los pacientes que no presentaron una VI desplazada (es decir, los pacientes cuyo endometrio se clasificó como receptivo), no se observaron diferencias significativas en las tasas de embarazo cuando se compararon las transferencias de embriones de acuerdo con la recomendación ER Map® con los métodos tradicionales (71,5% vs 64,3%). No se observó ningún efecto positivo ni negativo de la aplicación de ER Map® en estos pacientes.

CONCLUSIONES

ER Map® es una herramienta efectiva para la evaluación de la receptividad endometrial en pacientes en tratamiento de reproducción. La identificación de casos de desplazamiento de VI y programación personalizada de transferencia de embriones de acuerdo con la prueba ER Map® es una estrategia eficaz para mejorar los resultados de los tratamientos de reproducción asistida y lograr embarazos en casos de fallo repetido de FIV.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-030: OPTIMIZACIÓN DE LOS CICLOS DE DONACIÓN DE OVOCITOS EN FUNCIÓN DEL INDICE DE MASA CORPORAL

R. Sánchez García, E. Criado Scholz, A. Yus Castan
FIVMARBELLA, Marbella, Málaga

INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios demuestran que el Índice de Masa Corporal (IMC) es un factor importante a la hora de llevar a cabo técnicas de reproducción asistida. Está comprobado y analizado que IMC elevados suponen un menor número de éxitos en los tratamientos de fertilidad, debido a anomalías endocrinas y metabólicas. Sin embargo, pocos estudios hacen referencia a la importancia del IMC de la donante y cómo influye éste en el desarrollo de la estimulación en ciclos de donación. La escasa bibliografía existente se centra en relacionar IMC de donantes y receptoras y cómo influye en la tasa de embarazos.

OBJETIVO

El objetivo general es evaluar si existe un rango de IMC óptimo en el cual la tasa de Metafases II (MII) recuperados se ve aumentada. Si existiera, el objetivo específico será determinar dicho rango. A la vez se estudiará la repercusión del IMC en la dosis total empleada durante la estimulación.

MATERIAL Y MÉTODO

Se trata de un estudio retrospectivo con una muestra de 235 ciclos de donación en mujeres con una edad entre 18 y 33años, que han realizado el tratamiento con el mismo tipo de Hormona Folículo Estimulante (FSH). A partir de las historias clínicas de las donantes, se ha creado una base de datos donde se han introducido los datos relevantes para el estudio. Para este estudio se han recopilado datos de las estimulaciones llevadas a cabo desde agosto de 2016 hasta abril 2017, que siguen los criterios de inclusión mencionados anteriormente. Se ha llevado a cabo un análisis estadístico donde se han comparado las medias de MII recuperadas en función de los rangos de IMC establecidos por la Organización Mundial de la Salud. (IMC bajo: <18.5; IMC normal: 18.5-24.9; IMC sobrepeso: 25-29.9)

RESULTADOS

Los resultados obtenidos muestran que cuando el IMC es <18.5 la media de MII recuperadas en los diferentes ciclos es de 18.4 ovocitos. Con un IMC entre 18.5-24.9 la media es de 18.05 ovocitos, siendo prácticamente la misma que en el rango anterior. Finalmente con un IMC >25 hay una disminución de MII recuperadas siendo la media de 17.5 ovocitos.

Contrariamente a nuestra hipótesis, la relación existente entre IMC y dosis total utilizada en la estimulación refleja una tendencia a un aumento de la dosis total empleada conforme disminuye el IMC.

CONCLUSIONES

Tras analizar los resultados obtenidos se puede observar que la efectividad de los ciclos de donación en el grupo con IMC entre 25-29.9 se ve ligeramente disminuida ya que se recuperan menos MII. Se observa que cuando el IMC es <18.5 y entre 18.5-24.9 no hay diferencias.

Destacar que a menor IMC se ha empleado mayor dosis de medicación sin obtener mejores resultados en cuanto a número de MII recuperados. Ambos resultados nos llevan a la conclusión que con IMC 18.5-24.9, los ciclos de donación obtienen una optimización de los tratamientos, teniendo en cuenta MII recuperados y dosis empleada.

Se necesitan estudios posteriores que permitan aumentar la "n" de la muestra de cada grupo para poder realizar un estudio con significancia estadística.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-031: FREEZING PRIOR TO SPERM PREPARATION IMPROVES TOTAL AND PROGRESSIVE MOTILE SPERM COUNT, VIABILITY AND MORPHOLOGY IN FROZEN/THAWED SEMEN SAMPLES COMPARED WITH SPERM PREPARATION BEFORE FREEZING-THAWING PROCESS

A. Palomar Ríos (1), A. Gascón Sánchez (1), J.V. Martínez Sanchis (1), S. Balasch Parisi (2), I. Molina Botella (1)
(1) Unidad de Reproducción Asistida, Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, Valencia, España, (2) Departamento de Estadística e Investigación Operativa Aplicadas y Calidad, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España

INTRODUCTION

Indications for sperm cryopreservation include donor insemination, cryopreservation prior to surgical infertility treatment and malignancies and avoiding additional surgery in couples undergoing repeated IVF/ICSI cycles. However, dramatic changes during cryopreservation have detrimental effects on the sperm membrane, resulting in a large increase in the percentage of poorly motile sperm or sperm with abnormal morphology. Seminal plasma could perform a protective function during the freezing-thawing process. The negative effects related to rapid temperature decrease, such as osmotic injury, cellular dehydration, intra-cellular ice crystal formation, and oxidative stress can also lead to damage the sperm function affecting the reproductive outcome. In order to success in an ART treatment when sample availability is limited, not only sperm progressive motility (PM) has to be considered, but also the number of viable spermatozoa is crucial. So, total motility (TM), which approximates more accurately than PM to sperm viability, and total motile sperm count (TMSC) are relevant parameters to assess sperm quality.

OBJECTIVES

The purpose of this study is to evaluate which cryopreservation protocol, semen preparation before or after freezing, improves TMSC, viability and morphology after thawing.

MATERIAL AND METHODS

Comparative study between two cryopreservation protocols performed since January 2016 until August 2016. Semen samples presenting more than 4 ml of volume were considered. Semen samples from 40 normozoospermic men and 40 men presenting abnormal sperm parameters according the 2010 WHO were equally divided into two aliquots, one of which was processed by swim-up before cryopreservation (SF) while the other was prepared following cryopreservation (FS). A 0.5 ml aliquot of the same semen sample was used for each protocol. Slow freezing was used for sperm cryopreservation in 0.5 ml straws. Sperm preparation was performed by swim-up. Sperm count, PM, TM and morphology were performed using CASA system. Progressive motile sperm count (PMSC) and TMSC were calculated combining the sperm count together with PM or TM, respectively. Sperm vitality was assessed by HOS-test. All variables mentioned above were evaluated in fresh samples and after both cryopreservation protocols (SF and FS). Multivariate linear regressions and T-test of dependent samples were performed. P-values

RESULTS

PM, TM, PMSC, TMSC and the percentage of viable sperm (VS) in the semen samples prepared after cryopreservation (FS) were higher than that in the pre-freezing preparation group (SF) in the whole sample series (PM: 37.38%vs7.64%; TM: 38.71vs13.97%; PMSC: 5.41 • 106vs1.61 • 106 ; TMSC: 5.62 • 106vs2.56 • 106; VS: 38.93%vs14.93%, in all cases P6vs4.59 • 106). Regarding the morphology (M), percentage of normal sperm in fresh samples seemed to decrease when semen preparation was performed prior cryopreservation (4.05%vs3.05%, P=0.079). The semen samples behavior after freezing-thawing process was not influenced by the initial semen quality since no differences were observed between samples presenting normal or abnormal initial seminal parameters. Total motility in both, prepared and non-prepared samples, is more related to HOS-test results than progressive motility: HOS=0.38+0.97 • TM.

CONCLUSIONS

FS protocol resulted in better sperm quality than SF, resulting in higher TMSC, PMSC, viability and morphology. Therefore, it is demonstrated that sperm preparation after freezing should be considered to increase the available sperm number, especially in patients with poor sperm baseline undergoing repeated ICSI cycles. TM could assess sperm viability in a simpler way than HOS-test.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-032: LA MADUREZ DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA PODRÍA VARIAR EN MUESTRAS NORMALES DEPENDIENDO DE LA ÉPOCA DEL AÑO

S. González Hidalgo (1), E. Fernández Alegre (2), I. Crespo Félez (2), S. Rey Antón (2), F. Martínez Pastor (2)
(1) INDEGSAL y Biología Molecular (Biología Celular), Universidad de León, León (2) INDEGSAL y Biología Molecular (Biología Celular), Universidad de León, León

INTRODUCCIÓN

El análisis del semen es la prueba clínica de laboratorio más importante para la evaluación del factor masculino, con un interés creciente en el estado de la cromatina espermática. En este trabajo evaluamos el efecto de la época del año en una base de datos con datos sobre la compactación de la cromatina espermática (inmadurez).

OBJETIVO

Los objetivos fueron determinar si había un patrón de variación de la compactación de la cromatina espermática en la población de muestras con parámetros dentro de la normalidad, y si ese patrón se podría explicar estacionalmente.

MATERIAL Y MÉTODO

Se analizaron 2.096 muestras seminales de humano procedentes de clínicas de reproducción asistida españolas (2013-2015). Las muestras se analizaron mediante la técnica SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) para determinar fragmentación del ADN e inmadurez espermática. Se utilizó el entorno estadístico R para analizar los datos utilizando modelos lineares generalizados. En esta primera aproximación, se consideró sólo el día del año para explicar la variación de la variable %HDS (espermatozoides con cromatina poco compactada o inmadura). Los datos se agruparon en distintas épocas, comparándolos mediante el test x2. Los resultados se dan como media±desv. est.

RESULTADOS

Un 24,4% de las muestras presentaban una fragmentación superior al 25%, y un 14% de las muestras presentaba un valor superior al 15% de inmadurez. Estas muestras se descartaron, para estudiar sólo la población "normal". A pesar de la alta dispersión de la inmadurez (rango intercuartil 4,2 a 9,3) el modelo lineal mostró un efecto muy significativo del día del año (P

Al realizar una comparación entre estaciones, se observaron diferencias significativas entre todas, excepto invierno y primavera (con los resultados más bajos). Complementariamente, comparamos la incidencia de muestras con un porcentaje de inmadurez espermática superior al 15% (anormales), para determinar si la estación afectaba a la proporción de muestras diagnosticadas como de inmadurez alta. No encontramos un efecto significativo en este caso (P=0,910).

Dado que los datos sugerían un efecto de la temperatura ambiente (siendo improbable un efecto del fotoperiodo), realizamos otro análisis considerando además el retraso temporal necesario para que los espermatozoides afectados durante la espermatogénesis apareciesen en el eyaculado. Dividimos los períodos por temperaturas en frío (noviembre-marzo), cálido (junio-septiembre) e intermedio, aplicando 3 meses de desviación. Las diferencias entre épocas fueron muy significativas (P

CONCLUSIONES

La madurez de la cromatina espermática parece incrementarse levemente en los meses posteriores a los más cálidos, lo que sugiere que la espermatogénesis o la maduración se ven afectadas por el la temperatura ambiente. Nuestros resultados son limitados y deben considerarse con cautela hasta que se consideren posibles variables de confusión. Aunque este efecto no sería importante para la población general, sí puede serlo en pacientes con parámetros seminales alterados. Esto podría ser interesante en la planificación de los tratamientos de reproducción asistida y en el consejo a los pacientes en las épocas más sensibles.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-033: VALIDACIÓN CLÍNICA DE UN KIT PERSONAL DE ANÁLISIS CALIDAD SEMINAL; COMPARACIÓN CON RECUENTO CONVENCIONAL

D. Castelló Salom, V. García-Laez Moreno, A. Tejera Pastor, L. Alegre Ferri, M. Nohales Córcoles, M. Meseguer Escrivá
IVI Valencia, Valencia

INTRODUCCIÓN

El análisis seminal es una herramienta fundamental para el diagnóstico de la infertilidad masculina ofreciendo una información muy útil para el manejo de los tratamientos de Reproducción Asistida. Aproximadamente un 10-15% de parejas sufren infertilidad, siendo la evaluación del factor masculino el primer paso para su diagnóstico. Muchos hombres encuentran este análisis una experiencia desagradable e incluso provocarles estrés, el cual puede verse incrementado por el tiempo de espera hasta conocer los resultados. Por ello, realizar el análisis seminal de forma rápida y en un ambiente privado favorecerá la comodidad y tranquilidad para los pacientes.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio fue evaluar el uso de un kit de uso personal para el análisis de semen (SwimCount) como herramienta de evaluación de la calidad seminal, mediante la comparación con el espermiograma estándar.

MATERIAL Y MÉTODO

Un total de 323 muestras pertenecientes a hombres sometidos a tratamiento de infertilidad o donantes fueron incluidas en este estudio multicéntrico. Una vez obtenidas se dejaron licuar durante 30 min. para ser analizadas primero con la cámara de contaje Makler de recuento de espermatozoides móviles progresivos. Y posteriormente fue añadido un volumen de 0.5 mL al dispositivo SwimCount realizándose la lectura. Según el resultado obtenido, se clasificó el recuento de espermatozoides móviles progresivos como baja, normal o alta. Se utilizaron análisis por curva ROC para comparar la capacidad de diagnóstico o sensibilidad del test mediante el uso del programa estadístico SPSS.

RESULTADOS

Se obtuvieron unos resultados compatibles con aquellos obtenidos con el análisis de semen convencional. La concentración media de espermatozoides en las muestras analizada fue de 15.5 millones de espermatozoides móviles progresivos por mL. Aproximadamente un 23% de muestras de semen tuvieron un recuento de espermatozoides móviles progresivos por mL por debajo del umbral de 5 mill/mL, el cual es considerado como una concentración anormal (de acuerdo con la OMS). El área bajo la curva ROC de 0.95 fue obtenida comparando los resultados obtenidos del test con los valores del análisis tradicional. Una sensibilidad del 95% estaría en el rango de una concordancia excelente. Un buen equilibrio entre sensibilidad y especificidad fue obtenida en un valor de corte de 10.6 mill/mL de espermatozoides móviles progresivos, con una sensibilidad y especificidad de 88.1% y 93.3%, respectivamente.

CONCLUSIONES

Los resultados confirman la utilidad del kit como herramienta para evaluar la infertilidad masculina, ofreciendo altos niveles de concordancia entre los dos tipos de análisis. Además, ofrecen unos niveles altos de sensibilidad y especificidad. El kit es rápido, fácil y discreto, aunque no es un substituto de un análisis estándar como herramienta diagnóstica para tratamiento de infertilidad.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-034: LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA INFLUYE EN LA EVOLUCION EMBRIONARIA, EN INCUBACIÓN, HASTA EL D+5

J. Gijón de la Santa, M.C. Cañadas Gálvez, V. Badajoz Liebana
GINEFIV, Madrid

INTRODUCCIÓN

El correcto diagnóstico de una muestra seminal ha sido uno de los parámetros más importantes a la hora de diagnosticar las causas de una posible infertilidad. Sin embargo, con la aparición de técnicas como la Microinyeccion espermática (ICSI), la tendencia en los laboratorios de RA ha sido obtener y seleccionar espermatozoides y utilizarlos para la fecundación sin profundizar en la posible patología espermática.

En el laboratorio de andrología, la morfología es un parámetro que ha generado debate en los diferentes grupos de estudio, tanto por su subjetividad como por las diferencias de criterios posibles.

Por otra parte, el cultivo largo, hasta estadio de blastocisto, está cada día más presente en los laboratorios de RA y, con ello, aumentan las posibilidades de hacer un seguimiento del desarrollo embrionario más allá de su día +3.

OBJETIVO

Nuestro objetivo será observar la influencia de una morfología espermatica gravemente alterada en el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto tras la realizacion de una ICSI.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio sobre ciclos, realizados en nuestro centro en los años 2012-2016, en los que se había diagnosticado una morfología espermáticas gravemente alterada (≤2% de formas normales según el criterio de la OMS de 2010) Grupo A, y otros con muestras morfológicamente normales (>4% de formas normales) Grupo B; en ambos casos se consideraron los ciclos en los que se obtuvieron 5-10 ovocitos (propios) en estado de Metafase-II y se compararon los resultados del cultivo embrionario hasta D+3 y D+5.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:(ver tablas adjuntas)

Gr.A: Morfología alterada	Transferencia en día +3	Transferencia en día +5
Nº de ciclos	424	221
Embriones fecundados	6,03±1,13	6,27±1,72
Embriones totales	4,39±1,51*	3,45±1,62*
Tasa de gestación clínica	33,49%*	46,56%*

Gr.B: Morfología normal	Transferencia en día +3	Transferencia en día +5
Nº de ciclos	190	154
Embriones fecundados	6,05±1,13*	6,63±1,40*
Embriones totales	4,15±1,80	4,07±1,64
Tasa de gestación clínica	43,60%	45,07%

Siendo * el p valor menor de 0,05, lo que nos revela significancia estadística.

La media de embriones transferidos en día +3 fue de 1,72±0,48 y la media en transferencia en día +5 fue de 1,02 ±0,68.

CONCLUSIONES

La morfología espermática afecta al desarrollo embrionario: Los embriones del Grupo A alcanzan menor tasa de evolución a día + 5; por tanto, los pacientes con graves alteraciones en la morfología espermática se ven beneficiados de realizar un cultivo largo. La tasa de gestación en día +3, en el Grupo A, es mucho menor que la del Grupo B (33,49% frente a 46,56%).

Sin embargo, las tasas de gestación en día +5 no ofrecen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo A y B. (46,56% frente a 45,07%).

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-035: LA LONGITUD TELOMÉRICA EN ESPERMATOZOIDES NO ESTÁ RELACIONADA CON EL RESULTADO DEL EMBARAZO HASTA NIÑO NACIDO

M. Torra-Massana, M. Barragán Monasterio, E. Bellu, A. Rodríguez Aranda, R. Oliva Virgili, R. Vassena
Clínica EUGIN, Barcelona

INTRODUCCIÓN

Los telómeros son secuencias repetitivas de ADN, localizadas en los extremos de los cromosomas eucariotas, que tienen funciones importantes relacionadas con la integridad genética, el ciclo celular y la meiosis. La longitud telomérica (LT) en espermatozoides se ha planteado como un marcador de calidad espermática. Distintos estudios correlacionan menor LT en espermatozoides con oligozoospermia, astenozoospermia, menor cantidad de protaminas, menor calidad embrionaria, además de mayor fragmentación en ADN o mayor tasa de diploidías. Sin embargo, pocos estudios se han centrado en evaluar la LT en espermatozoides como marcador de tasas de embarazo o nacido vivo. Además, en todos estos estudios se hace imposible aislar el efecto de la LT en espermatozoides de todas las variables de ciclo de reproducción asistida (RA), especialmente las características de la mujer.

OBJETIVO

Analizar el efecto de la LT en espermatozoides sobre la calidad embrionaria y las tasas de fecundación, implantación, embarazo y nacido vivo, aislando las variables asociadas al factor femenino o al tipo de ciclo de RA.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio de andrología molecular que incluye muestras de semen de 60 donantes. Para cada muestra se realizó extracción de ADN y se determinó la LT relativa mediante PCR cuantitativa, calculándola como el ratio entre ADN telomérico y un gen de copia única (RPLP0). Cada donante se utilizó para llevar a cabo el tratamiento de fertilidad de entre 7 y 12 mujeres, y se generó una base de datos que incluye información de un total de 676 ciclos de FIV. Mediante análisis univariado se analizó el efecto de la LT en calidad embrionaria y tasas de fecundación, fecundación anómala, implantación, embarazo clínico y nacido vivo, incluyendo test de correlación Rho-Spearman y test de Mann-Whitney U. Calidad embrionaria, tasa de fecundación y probabilidades de embarazo en función de la LT en espermatozoides se evaluaron también mediante regresión de LOWESS. El efecto de la LT en todas las variables anteriores se analizó mediante análisis multivariado ajustando por concentración y movilidad espermática, edad del donante y de la mujer, IMC, número de ovocitos inyectados, estadio, número y calidad de los embriones transferidos.

RESULTADOS

La LT media en espermatozoides fue 4.5 (SD 1.9, rango 2.4-14.2, unidades arbitrarias). Las tasas fueron 48.8%, 38.8%, 30.9% y 21.9% para embarazo bioquímico, clínico, en curso y nacido vivo, respectivamente. La regresión de LOWESS no mostró correlaciones significativas entre LT y tasas de embarazo, y no se encontró correlación entre LT y calidad embrionaria (p=0.08), tasa de fecundación (p=0.35) y tasa de fecundación anómala (p=0.65). La LT no fue diferente en aquellos ciclos que acaban en embarazo y los que no (p>0.05 para todas las tasas), y no se encontró efecto significativo de la LT en los resultados reproductivos, con OR por cada unidad de LT de 0.94, 0.99, 0.98 and 0.93 para tasa de embarazo bioquímico, clínico, en curso y tasa de niño vivo, respectivamente. El análisis multivariado confirmó que el efecto de la LT en espermatozoides no es significativo sobre las tasas de fecundación (p=0.53), fecundación anómala (p=0.58), embarazo bioquímico (p=0.41), clínico (p=0.99), en curso (p=0.77) y niño nacido (p=0.60). Aunque la calidad embrionaria dio resultados significativos (p=0.003, coeficiente –0.246), ni la magnitud ni el sentido de este efecto parecen ser clínicamente relevantes.

CONCLUSIONES

La LT en espermatozoides, aislando las variables asociadas al factor femenino, no parece relacionarse con calidad embrionaria ni tasas de embarazo en individuos normozoospérmicos. Independientemente de su posible relación con otros parámetros seminales, la determinación de LT parece ser de poca relevancia como predictor del éxito en ciclos de reproducción asistida.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-036: DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA CRIORRESISTENCIA ESPERMÁTICA EN DONANTES DE SEMEN

E. Sellés Soriano (1), P. Hernández-Vargas (1), N. Garrido Puchalt (2), F. Vilella (3), I. Pérez Cano (1), M. Muñoz Cantero (1)
(1) IVI Alicante, Alicante, (2) Fundación IVI, (3) Igenomix

INTRODUCCIÓN

La criopreservación seminal se emplea de forma rutinaria en reproducción asistida (RA) por diversas causas y resulta imprescindible para el mantenimiento en cuarentena del semen de donante. El proceso de congelación-descongelación seminal lleva consigo una pérdida de movilidad espermática que repercute sobre su calidad y competencia reproductiva. Una idéntica calidad seminal entre distintos individuos da lugar a diferentes resultados en los parámetros al descongelar. Por ello, la selección de muestras de donantes con buena capacidad de descongelación resulta importante para crear un banco óptimo. El poder diagnóstico del espermiograma es limitado a la hora de explicar la calidad seminal post-descongelación y no analiza factores moleculares implicados en su resistencia o intolerancia a la criopreservación. Las bases moleculares de una adecuada criorresistencia seminal son aún desconocidas. Los análisis de expresión génica mediante microarrays pueden ayudarnos a conocer los genes y mecanismos implicados en la sensibilidad al criodaño y explicar la diferente respuesta a la criopreservación.

OBJETIVO

Caracterizar los patrones de expresión génica de muestras de semen dependiendo de la resistencia a la criopreservación con el fin de profundizar en los procesos biológicos que intervienen en la sensibilidad al criodaño.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio prospectivo de cohortes con muestras seminales (n=28) de varones del programa de donación de nuestra clínica, seleccionados por su calidad seminal con los criterios habituales del centro (>40-50 millones espermatozoides/ml, >50% de movilidad progresiva) y de acuerdo con la normativa vigente sobre RA. Las muestras de semen de donantes se congelaron y descongelaron mediante protocolos convencionales y se categorización según su sensibilidad al proceso considerando como más resistentes (ODD-ratio espermatozoides móviles progresivos descongelados/ fresco >0,5988; n=14) y menos resistentes (ODD-ratio espermatozoides móviles progresivos descongelados/ fresco <0,5988; n=14). Se extrajo el ARNm con el kit de QIAgen y se evaluó su calidad mediante el Agilent Bioanlyzer 2100, antes de realizar el microarray (Agilent Whole Genome Microarray, 4x44K) con las muestras individuales. Las variables a determinar, tras el consiguiente análisis de datos mediante Limma moderated t-statistic, fueron los genes diferencialmente expresados (mínimo 2-fold en un grupo respecto del otro y p<0,05). Los datos se analizaron posteriormente con la ayuda de Gene Ontology Biological Process para la categorización funcional de los productos génicos de acuerdo a tres aspectos: procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares. Se empleó para ello un nivel de significación estadística de 0,05.

RESULTADOS

Resultados del análisis de expresión diferencial: de un total de 19619 genes no se observó ningún gen diferencialmente expresado en un grupo respecto del otro.

Resultados de análisis funcional: de los 5648 procesos biológicos analizados, se encontraron cambios significativos en 86 de ellos entre las muestras más y menos resistentes a la criopreservación (13 regulados al alta y 73 a la baja). Igualmente, entre ambos grupos se observaron diferencias significativas en 39 de los dominios relacionados con los componentes celulares (3 con regulación a la alta y 36 a la baja) y en 2 relacionados con las funciones moleculares (1 regulada al alta).

CONCLUSIONES

A pesar de que, posiblemente debido al tamaño muestral analizado hasta el momento, no se ha encontrado ningún gen diferencialmente expresado cuando se comparan muestras seminales de donantes más o menos resistentes a la criopreservación, este trabajo evidencia que existen diferencias moleculares capaces de producir cambios funcionales significativos a nivel de numerosos procesos biológicos entre ambos grupos. En nuestra previsión de seguir aportando más muestras al estudio, pretendemos profundizar en las relaciones entre los genes y su función en los procesos biológicos que intervienen en la resistencia o sensibilidad al criodaño. Todo esto, nos permitiría crear un banco de semen de mejor calidad además de conocer mejor la fisiología de la congelación espermática.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-037: RELACIÓN ENTRE LAS NULISOMÍAS ESPERMÁTICAS Y LA CALIDAD SEMINAL

B. Navarro Santos (1), N. Subirán Ciudad (2), M. Gianzo Citores (2), T. Ganzabal Areso (1), I. Ausín Hernández (1), S. Quevedo Galván (1), S. Bringas Manzano (3), C. Jiménez Viruega (1), M. Mandiola Arizmendiarrieta (1)
(1) Quirón Salud Bilbao, (2) UPV, (3) San José de Calasanz.

INTRODUCCIÓN

La infertilidad afecta a aproximadamente el 15 % de las parejas, la mitad de dichos casos se debe al factor masculino. La infertilidad masculina está relacionada con anomalías numéricas de los cromosomas de los espermatozoides debidas a una incorrecta separación de las cromátidas hacia los polos durante la anafase de la meiosis. Existen publicaciones sobre la relación entre la calidad seminal y las tasas de aneuploidías encontrándose resultados contradictorios. Pero si existen evidencias de que los embriones procedentes de espermatozoides aneuploides pueden conllevar a fracasos reproductivos e incrementan la incidencia de abortos espontáneos y a nacimientos de niños con severos defectos congénitos.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es analizar si existe una relación directa entre la nulisomía de uno o varios cromosomas de los espermatozoides con la calidad seminal para el posible cribado de espermatozoides aneuploides durante los Tratamientos de Reproducción Asistida.

MATERIAL Y MÉTODO

Para el estudio de la presencia de anomalías numéricas cromosómicas en los espermatozoides se emplea la Hibridación In Situ Fluorescente (FISH). En el estudio fueron incluidos 86 pacientes que acudieron a la Unidad de Reproducción Asistida entre los años 2012 y 2015, que presentaban cariotipo normal y que realizaron el estudio FISH de espermatozoides de nueve cromosomas (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X e Y). Las indicaciones para la realización de FISH fueron: a) aborto de repetición de etiología desconocida, b) factor masculino, c) fracaso de técnicas de reproducción asistida y, d) otras causas (mal desarrollo embrionario y baja tasa de fecundación). Previamente, se evaluaron los parámetros seminales de estos pacientes (volumen, concentración, movilidad, morfología y viabilidad) siguiendo los criterios de la OMS 2010. El estudio estadístico se realizó utilizando el sofware IBM SPSS Statistics versión 22 y se realizaron las pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov), test no paramétricos U de Mann-Whitney y análisis de la Ji cuadrado.

RESULTADOS

Tras el análisis de FISH en espermatozoides, 15 muestras espermáticas presentaban FISH normal, mientras que 71 presentaban algún tipo de anomalía genética, de las cuales 67 eran nulisomias. Para este estudio se analizó la relación existente entre la presencia de nulisomías y los parámetros seminales básicos. Concretamente, observamos que las muestras procesadas con nulisomías de los cromosomas 13, 15, 16, 17 y 22 presentaban un menor porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva en comparación a las muestras no nulisómicas para cada uno de los cromosomas. Además, se observó una relación positiva entre inmovilidad de las muestras capacitadas en la nulisomía del 16 y una relación negativa entre la concentración de las muestras procesadas con la nulisomía del cromosoma 13. Analizando las patologías asociadas a dichas muestra nulisómicas observamos que 22 eran normozoospérmicas, 3 oligozoospérmicas, 5 astenozoospérmicas, 11 teratozoospérmicas, 19 tenían dos de las patologías antes citadas, 6 eran oligoastenoteratozoospérmicas y 1, necrozoospérmica.

CONCLUSIONES

Nuestros datos, por tanto, sugieren la existencia de una relación entre la presencia de algún tipo de nulisomía espermática con el porcentaje de movilidad progresiva tras la capacitación espermática, sin estar asociado a ninguna etiología seminal concreta.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-038: LA REACCIÓN ACROSÓMICA IMPLICA MODIFICACIONES EN LA DISTRIBUCIÓN DEL ÁCIDO SIÁLICO Y EN LA MORFOMETRÍA DEL SEGMENTO ECUATORIAL DEL ESPERMATOZOIDE HUMANO

P. Sáez Espinosa (1), N. Huerta Retamal (1), L. Robles Gómez (1), M. Avilés (2), J. Aizpurua (3), A. Romero (1), M.J. Gómez Torres (1)
(1) Departamento de Biotecnología, Universidad de Alicante, San Vicente del Raspeig, Alicante, España, (2) Departamento de Biología Celular e Histología, Universidad de Murcia e IMIB, Murcia, España, (3) IVF Spain, Reproductive Medicine, Alicante, España

INTRODUCCIÓN

La morfología del gameto masculino se considera un indicador de la capacidad fecundante de los espermatozoides1. No obstante, una definición óptima de su morfología no implica necesariamente la correcta funcionalidad, muchas veces ligada a la incapacidad de unión entre el espermatozoide, ya sea con la zona pelúcida2 o el oolema3 del ovocito. En este contexto, la relación entre la distribución de los glicoconjugados de membrana plasmática implicados en la fecundación y la morfometría del espermatozoide humano no ha sido hasta ahora analizada en detalle.

OBJETIVO

Estudiar las modificaciones morfométricas tras la inducción de la reacción acrosómica en el segmento ecuatorial del espermatozoide humano y evaluar los cambios de localización del ácido siálico en estas condiciones fisiológicas.

MATERIAL Y MÉTODO

En este estudio evaluamos muestras espermáticas normozoospérmicas. La capacitación de la muestra se llevó a cabo mediante swim-up y la inducción de la reacción acrosómica con ionóforo de calcio A23187. Para evaluar la reacción acrosómica se utilizó la lectina Pisum sativum agglutinin (PSA) conjugada con FITC y la distribución de ácido siálico se detecto mediante la lectina Wheat germ agglutinin (WGA). El resultado fue examinado mediante microscopia confocal evaluando un mínimo de 200 espermatozoides por muestra. Por otra parte, el análisis morfométrico del espermatozoide se realizó a partir de micrografías 10,000× obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido y a partir de técnicas de Morfometría Geométrica (MG)4. La forma del espermatozoide se extrajo a través de una configuración de landmarks alrededor de la periferia de la cabeza y utilizando la superposición generalizada de Procrustes de mínimos cuadrados.

RESULTADOS

En relación a la valoración de la reacción acrosómica mediante PSA, tras la inducción de la reacción acrosómica un 82,00 ± 8,85% de los espermatozoides se encontraban reaccionados, frente al 17,50 ± 5,25% registrado en los controles. La fluorescencia de la WGA fue evaluada a partir del registro de 4 patrones definidos como región acrosomal (P1), segmento ecuatorial (P2), región cefálica punteada (P3) y contorno de la membrana plasmática a nivel cefálico (P4) (Figura 1).

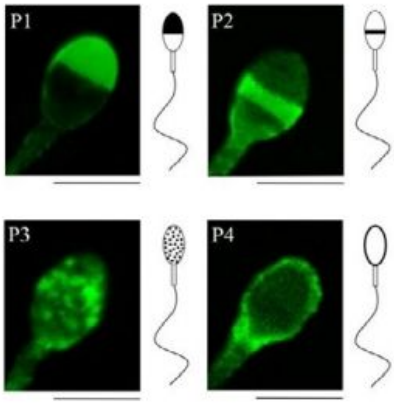


Figura 1. Patrones de fluorescencia observados con la lectina WGA. Región acrosomal (P1), segmento ecuatorial (P2),región cefálica punteada (P3) y contorno de la memembrana plasmática a nivel cefálico (p4). Barra de escala: 5µm.

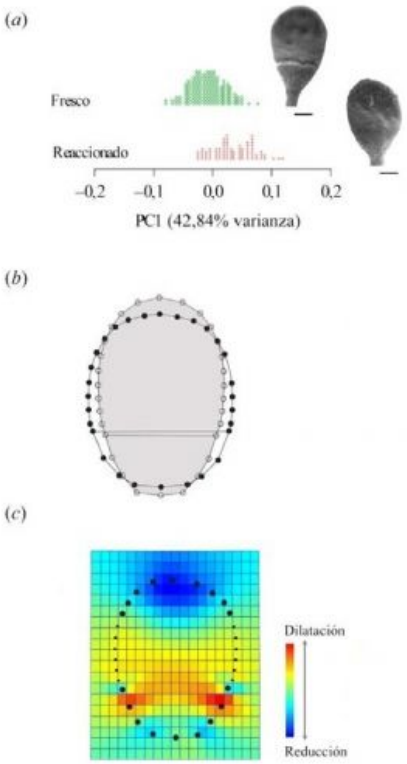


Figura 2. Variación de la morfometría del espermatozoide. (a) Distribución de los casos en el primer Componente Principal (PC1) de forma. Micrografías MEB 10,000× de fresco y reaccionado; escala 1µm en todos los casos. (b) Cambios de forma (wireframes) en los extremos negativo y positivo con respecto al consenso (gris). (c) Nótese el cambio de conformación (mapas de deformación) que afectan a la reducción del acrosoma y dilatación del segmento ecuatorial.

En cuanto al registro morfométrico tras la reacción acrosómica se observó que en el espermatozoide humano se produce una disminución del acrosoma y una dilatación del segmento ecuatorial (Figura 2). La disminución del acrosoma está asociada a la descrita exocitosis del

contenido de la vesícula acrosómica5. Sin embargo, la dilatación del segmento ecuatorial podría estar relacionada con la incorporación de parte del contenido acrosomal necesario para continuar con el proceso de penetración espermática6. Además, la expansión del segmento ecuatorial también se corrobora con la relocalización de la WGA, disminuyendo significativamente la fluorescencia de ácido siálico en el acrosoma (P1) y aumentando en la región del segmento ecuatorial (P2) (Figura 1 y Tabla 1). Del mismo modo, la ausencia de ácido siálico tras la reacción acrosómica en la región acrosomal sería un marcador de la pérdida de la membrana acrosomal externa, la cual permite desenmascarar moléculas presentes en la membrana interna implicadas en el reconocimiento de la zona pelúcida7.

de la cabeza del espermatozoide, sugiriendo implicaciones importantes en el proceso de dilatación ecuatorial tras la inducción de la reacción acrosómica. Por lo tanto, este trabajo demuestra que el estudio simultáneo de diferentes biomarcadores espermáticos y la aplicación de nuevas herramientas morfométricas, permiten definir de forma precisa los cambios celulares y moleculares que experimenta el espermatozoide en diferentes condiciones fisiológicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. Fertil Steril. 1988;49:112-7.

2. Liu DY, Clarke GN, Martic M, Garrett C, Baker HW. Frequency of disordered zona pellucida (ZP)-induced acrosome reaction in infertile men with normal semen analysis and normal spermatozoa-ZP binding. Hum Reprod. 2001;16:1185-90.

3. Bianchi E, Doe B, Goulding D, Wright Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. Nature. 2014;508:483-87.

4. Zelditch ML, Swiderski DL, Sheets HD, editores. Geometric morphometrics for biologists: A primer. Amsterdam: Academic Press; 2012.

5. Visconti PE, Galantino-Homer H, Moore GD, Bailey JL, Ning X, Fornes M, et al. The molecular basis of sperm capacitation. J Androl. 1998;19:242-48.

6. Tecle E, Gagneux P. Sugar-coated sperm: Unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx. Mol Reprod Dev. 2015;82:635-50.

7. Lassalle B, Testart J. Human zona pellucida recognition associated with removal of sialic acid from human sperm surface. J Reprod Fertil. 1994;101:703-11.

Condición fisiológica	P1	P2	P3	P4
No capacitado	60,15 ± 12,45	6,69 ± 8,00	24,00 ± 8,18	9,15 ± 9,55
Reaccionado	36,92 ± 13,62*	29,00 ± 20,52*	22,69 ± 11,93	11,38 ± 5,39

Tabla 1. Los valores muestran media ± σ (%) para cada patrón (P1-4). Patrones significativamente diferentes (t-test; p<0,05) entre no capacitado y reaccionado (*).

CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran que la distribución del ácido siálico covaría con importantes cambios en la morfometría

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-039: IMPACTO DE LA MORFOLOGÍA OVOCITARIA EN LA SUPERVIVENCIA, FECUNDACIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO EN CICLOS DE VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS

A. Coello Perles, E. Sánchez Chiva, P. Campos Lozano, B. Vallejo Villanueva, J. Serrano Notorio, M. Meseguer Escrivá, A. Cobo Cabal
IVI Valencia, Valencia

INTRODUCCIÓN

La calidad ovocitaria es un factor predictivo importante, tanto del desarrollo embrionario como del éxito reproductivo en un tratamiento de fecundación in vitro. Por este motivo, el efecto de las anomalías del ovocito sobre su calidad y potencial de desarrollo ha sido un campo ampliamente estudiado. Sin embargo, la información existente sobre la influencia de estos dismorfismos ovocitarios en ciclos de vitrificación de ovocitos es escasa y no concluyente.

OBJETIVO

Estudiar la influencia de los dismorfismos ovocitarios sobre las tasas de supervivencia, fecundación y desarrollo embrionario en ciclos propios de vitrificación de ovocitos.

MATERIAL Y MÉTODO

El estudio incluyó un total de 88 ciclos donde 416 ovocitos fueron vitrificados. La evaluación morfológica se realizó antes de la vitrificación utilizando un microscopio a 400 aumentos.

Se detectaron 147 ovocitos que presentaban una o más anomalías morfológicas. Los 269 ovocitos restantes fueron evaluados como "ovocitos morfológicamente normales". Entre los dismorfismos analizados se encontraban: granulosidad citoplasmática difusa, área de granulosidad citoplasmática central, agrupaciones de retículo endoplasmático liso, vacuolas, anormalidades de forma, espacio perivitelino aumentado y zona pelúcida anormal. Los ovocitos se vitrificaron y desvitrificaron con el método Cryotop® (KitazatoBiopharma). En un primer análisis se compararon las tasas de supervivencia, fecundación y desarrollo embrionario entre ovocitos normales morfológicamente y ovocitos dismórficos. Se utilizó el test chi cuadrado donde $p<0,05$ se consideró estadísticamente significativo y se calculó la odd ratio para cada variable. Posteriormente, en un segundo análisis los ovocitos dismórficos se dividieron en dos grupos según si presentaban una o más anormalidades morfológicas. Finalmente, se analizaron las variables anteriormente mencionadas entre los dismorfismos más abundantes.

RESULTADOS

La tasa de supervivencia fue de 81,4 en ovocitos morfológicamente normales y de 86,4% en ovocitos dismórficos (OR=1,4; 95%CI = 0,8-2,5). La tasa de fecundación fue de 69,8 vs. 66,9% (OR=0,9; 95%CI= 0,6-1,4) y la tasa de llegada a blastocisto de 54,5% vs 60,5% (OR=1,3; 95%CI= 0.5-2.7) para ovocitos morfológicamente normales vs. ovocitos dismórficos, respectivamente (NS). No se encontraron diferencias significativas en cuanto a supervivencia, fecundación y desarrollo a blastocisto entre los ovocitos que presentaban uno o más dismorfismos (Tabla 1). El análisis de las anomalías puras más frecuentes (área de granulosidad citoplasmática central y anomalías de la zona pelúcida) no reveló diferencias significativas respecto a los ovocitos morfológicamente normales.

CONCLUSIONES

La presencia de anomalías morfológicas no afecta la tasa de supervivencia, fecundación y desarrollo a blastocisto en ciclos de vitrificación con ovocitos de pacientes.

Tabla I. Desarrollo embrionario según el número de dismorfismos

	Dismorfismo único	IC 95%	Dismorfismo múltiple	IC 95%
Nº ovocitos	80		67	
Tasa de supervivencia (%)	71/80 (88,7)	81,8-95,6	57/67 (85,1)	76,6-93,6
Tasa de fecundación (%)	48/71 (67,6)	56,7-78,5	37/57 (64,9)	52,5-77,3
Calidad superior d3/ovocitos fecundado (%)	16/48 (33,3)	20,0-46,6	9/37 (24,3)	10,5-38,1
Tasa de llegada a blastocisto (%)	14/20 (70,0)	49,9-90,1	12/23 (52,2)	31,8-72,6
Tasa de llegada a blastocisto/ovocito fecundado(%)	14/48 (29,2)	16,3-42,1	12/37 (32,4)	17,3-47,5

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-040: ¿QUÉ NIVEL DE PROGESTERONA ES EL ADECUADO EN UN CICLO DE FIV?

M. Mandiola Arizmendiarreta, L. Rodríguez Vierbücher, M. Soubelet Fagoaga, I. Martínez Amundarain, K. Carbonero Martinez, F. Atutxa Esparta, Y. Álvarez Espinosa, J. Martínez Amuchastegui
Hospital de día Quironsalud Donostia, San Sebastián, Guipuzcoa

INTRODUCCIÓN

El nivel de progesterona puede estar afectado por los protocolos de estimulación en los ciclos de FIV. Numerosos autores han hecho referencia al efecto deletéreo que la progesterona aumentada puede tener sobre las tasas de embarazo. Hace varios años, tras analizar los datos de nuestro laboratorio, nuestro grupo estableció el punto de corte para la progesterona en 1,5 µg/l. En los casos en los que el valor supera ese límite, vitrificamos todos los embriones para posponer la transferencia. De este modo conseguimos mejorar nuestros resultados.

OBJETIVO

El próposito actual es determinar si también los niveles bajos de progesterona afectan los resultados de los ciclos de FIV y si fuera el caso establecer el punto de corte inferior.

MATERIAL Y MÉTODO

Analizamos retrospectivamente 338 ciclos de FIV/ICSI realizados durante los años 2014, 2015 y 2016. Se trata de ciclos estimulados con FSH recombinante con análogos o antagonistas de la GnRH, suplementados con LH o no, según el protocolo de estimulación más adecuado a cada paciente. La ovulación en todos los casos se desencadenó con hCG recombinante.

A todos ellos se les habían analizado los niveles de progesterona plasmática el día de la inyección de la hCG.

RESULTADOS

Observamos que los niveles de progesterona 1-1.5 µg/l aportan mayores tasas de embarazo 42.59% vs 33.52% (prog <1.5 µg/l), cuyos datos son estadisticamente significativos. También vemos que la tasa de aborto es inferior 30.43% vs 33.90% (estadísticamente no significativo).

De la misma manera analizamos los resultados en función de los niveles de progesterona 0.75-1.5 µg/l vs <0.75 µg/l, obteniendo tasas de embarazo del 40.23% vs 29.87% y de aborto 30.48% vs 39.13%. Las diferencias son estadisticamente significativas para los dos parámetros.

CONCLUSIONES

Parece ser que no sólo los niveles altos de progesterona comprometen el embarazo, sino que también los bajos, aunque son necesarios más estudios. Según nuestros resultados deberíamos tener en consideración, que los niveles bajos de progesterona tampoco son la mejor situación para realizar la transferencia embrionaria en fresco. Por ello, proponemos establecer un punto de corte inferior, que se sitúa en 0.75 µg/l.

BIBLIOGRAFÍA

Bosch E., Labarta E. Crespo J., Simon C., Remohí J., Jenkins J., Pellicer A. Circulatin P level and ongoing pregnancy rates in controlled ovarían stimulation cycles for in vitro fertilization: analysis of over 4.000 cycles. Hum Reprod. 2010; 25: 2092-100.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-041: INCUBACIÓN Y SELECCIÓN EMBRIONARIA COMPARANDO UN NUEVO SISTEMA TIME-LAPSE (GERI®) CON UN INCUBADOR MINC: HACIA LA TRANSFERENCIA DEL EMBRIÓN ÚNICO

C. Luna Cañas (1), L. Ortega (1), J.A. Guijarro (2), E. Olaya (1), S. Cortes (1), C. Cordero (1), A. Rodrigo (1), R. Núñez (1), P. Caballero (1)
(1) Clínica Tambre, Madrid, (2) Hospital Universitario Cuenca, Cuenca

INTRODUCCIÓN

Monitorizar el desarrollo embrionario con un sistema time-lapse puede mejorar los resultados en los cultivos y selección embrionaria. Además se ha demostrado que los cultivos a bajas concentraciones de oxígeno son beneficiosas para el desarrollo de estos si los comparamos con cultivos a concentraciones del 20% de oxígeno. El incubador Geri® es un incubador de sobremesa diseñado para proporcionar un ambiente individualizado y mantener la concentración al 5% de oxígeno, dando a cada embrión la máxima capacidad de desarrollo.

OBJETIVO

Comparar la incubación en un incubador Geri® frente a la incubación en un incubador MINC comparando la tasa de desarrollo a blastocisto mediante una validación interna del desarrollo pre-clínico, para determinar si aumenta la selección embrionaria electiva en transferencias de embrión único (SET) mientras que se mantiene la tasa de embarazo.

MATERIAL Y MÉTODO

Se han analizado prospectivamente ciclos de FIV-ICSI correspondientes a 116 pacientes, realizados desde Junio a Noviembre de 2016, en los que los embriones se cultivaron hasta el estadio de blastocisto. Los ciclos fueron randomizados para incluirlos en incubadores Geri® (n=66) o incubadores MINC (n=50). Se evaluaron 968 embriones, que fueron incubados en medios secuenciales hasta el día 5 de desarrollo. Se comparó la proporción de blastocistos, la calidad de estos, el número de transferencias de embrión único y la tasa de embarazo clínico. La tasa de embarazo se determinó por la presencia ecográfica de latido fetal positivo a las 8 semanas de la transferencia embrionaria.

RESULTADOS

Se observó una tendencia superior en el porcentaje de embriones que llegaron al estadio de blastocisto en el grupo del incubador Geri®, pero estas diferencias no fueron significativas (66, 46% vs 61, 49%; p: 0,162) así como tampoco el número de embriones de buena calidad (41, 77% vs 37, 93%; p: 0,218).

No se encontraron diferencias en las tasas de embarazo clínico al comparar transferencias de embriones incubados en Geri® o en MINC (59, 1% vs 46%; p: 0,211 OR: 1, 44 (0,884-2,359) p: 0,142). Tampoco hubo diferencias entre ambos grupos al comparar el número de ciclos en los que al menos 1 embrión de buena calidad fue transferido o congelado (97% vs 94%; p: 0,435) o en los que hubo al menos 2 embriones de buena calidad (71, 2% vs 72, 0%; p: 0,926). A pesar de estos datos, el número de ciclos SET fue significativamente superior en el grupo de los incubadores Geri® (88, 1% (37/42) Geri vs 64, 7% (22/34) MINC; p: 0,015 OR: 4,036 p: 0,019) comparado con el grupo de los incubadores MINC. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la tasa de embarazo viable en ciclos SET del grupo de Geri® (69%; 29/42) frente al grupo de MINC (55, 9%; 19/34) p: 0,237 OR: 1, 76 (0, 69-4, 52) p: 0,239.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados no muestran diferencias signifcativas en la selección embrionaria entre incubadores Geri® y MINC respecto al desarrollo a blastocisto y embriones de buena calidad. Las tasas de embarazo fueron comparables en ambos grupos, aunque hubo significativamente más transferencias SET usando incubadores Geri®, probablemente debido a que la selección embrionaria con Geri® permite seleccionar el mejor embrión para transferir.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-042: RELACIÓN ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DEL EMBRIÓN, SEGÚN CRITERIOS DE ASEBIR, Y LA APARICIÓN DE MOSAICISMO EN BIOPSIAS DE BLASTOCISTOS

A. Rodríguez Arnedo (1), J. Ten Morro (1), M. Díaz Martínez (1), L. Martí Ferri (1), I. Ochando Sánchez (2), J.A. Ortíz Salcedo (3), J. Guerrero Villena (1), L. Cascales Romero (4), J. Llácer Aparicio (1), R. Bernabeu Pérez (1)
(1) Instituto Bernabeu Alicante, (2) Instituto Bernabeu Albacete, (3) Instituto Bernabeu Biotech, Alicante, (4) Instituto Bernabeu Madrid

INTRODUCCIÓN

El principal proceso causal del mosaicismo en el embrión preimplantatorio es el retraso en la Anafase. Es bien sabido que en embriones en estadío de división la frecuencia de aparición de mosaicismo es mayor respecto al estadío de blastocisto. En la actualidad, la sensibilidad de las técnicas de diagnóstico genético hace posible la detección de embriones mosaicos. El mosaicismo y las aneuploidías son habituales durante las primeras divisiones embrionarias (Taylor et al., (2014), por lo tanto, sería importante saber en qué punto del desarrollo el embrión comienza a generar líneas celulares con diferentes números de copias cromosómicas.

OBJETIVO

Establecer una relación entre los criterios de clasificación morfológica embrionaria ASEBIR y la aparición de mosaicismo tras biopsia de trofoectodermo.

MATERIAL Y MÉTODO

Análisis retrospectivo de 1.039 blastocistos biopsiados en día 5 ó 6 de desarrollo embrionario desde enero de 2014 a diciembre de 2016. Se creó una base de datos en la que se registraron los siguientes parámetros: número de células, simetría y grado de fragmentación en día 2 y 3 de desarrollo embrionario. Se estableció la calidad embrionaria de acuerdo a los criterios de clasificación de ASEBIR (A, B, C y D). Los datos fueron analizados y relacionados con el estatus cromosómico obtenido mediante array-CGH en nuestro programa de PGS.

RESULTADOS

La calidad embrionaria en día 2 y día 3 no se asoció con la presencia de mosaicismo en estadío de blastocisto (p=0.5 y p=0.5, respectivamente). Si consideramos el grado de fragmentación embrionaria en día 2 y día 3, tampoco observamos ninguna relación con el mosaicismo (p=0.7 y p=0.8, respectivamente). Para valorar específicamente la simetría embrionaria, se establecieron 3 grupos: grupo A: simétrico, grupo B: ligeramente asimétrico (diferencia de tamaño entre las blastómeras menor del 20%), y grupo C: asimétrico. En día 2 los porcentajes de embriones mosaico en cada grupo fueron 12.2%, 5% y 25%, respectivamente, presentando diferencias estadísticamente significativas (p=0.004). Por el contrario, en día 3 los porcentajes de embriones mosaico en cada grupo fue similar (12.8%, 11.5% y 8.6%, respectivamente, p=0.7). Finalmente, no se observaron diferencias significativas en cuanto al número de células tanto en día 2 como en día 3 y la presencia de embriones mosaico.

CONCLUSIONES

Los parámetros morfocinéticos podrían estar relacionados con el haplotipo del embrión preimplantatorio. Ni el número de células ni la fragmentación en los días 2ª y 3ª de desarrollo embrionario, presentan mayores incidencias de mosaicismo; la asimetría en día 2 parece que sí afecte seriamente al resultado final del estatus cromosómico embrionario. La forma en la que se llevan a cabo estas primeras divisiones embrionarias puede condicionar la aparición de mosaicismos en el embrión en fase de blastocisto.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-043: VALIDACIÓN CLÍNICA DE UN NUEVO ANÁLISIS AUTOMÁTICO PARA LA SELECCIÓN DE EMBRIONES BASADA EN LA MONITORIZACION CONTINUA POR CINEMATOGRÁFIA

C. Albert Rodríguez, B. Aparicio Ruiz, L. Alegre Ferri, L. Romany Sevilla, J. Remohí Giménez, M. Meseguer Escribá
Instituto Valenciano de Infertilidad, Valencia

INTRODUCCIÓN

El éxito de la reproducción asistida depende en gran medida de la selección del mejor embrión para transferir. La tecnología time lapse nos permite descubrir los momentos clave de la evolución embrionaria. Sin embargo no todos los embriones aparentemente mejores, implantan.

OBJETIVO

Evaluar si un programa de valoración automática de los embriones, puede clasificarlos en función de su potencial de implantación, aportando una herramienta más para una mejor selección del embrión a transferir

MATERIAL Y MÉTODO

El nuevo programa de evaluación (DANA) se basa en la similitud de los valores cinéticos cc2 (t3-t2) y t3 de cada uno de los embriones con los valores de dichos parámetros en embriones con implantación conocida. El sistema posiciona los embriones en una gráfica bidimensional y calcula automáticamente su distancia respecto a los 20 embriones más cercanos que implantaron correctamente, proporcionando un valor medio definido como UAD (unidad de distancia media). A continuación, clasifica todos los embriones de la cohorte en función de dicho valor medio, que es por tanto independiente de la calidad de los mismos pero que ayuda en la selección de los mejores embriones.

El estudio consta de 3 fases: La primera es un análisis retrospectivo de embriones de 799 parejas del programa de donación de ovocitos. La segunda fase, es un análisis prospectivo embrionario de 274 pacientes en los que seleccionamos los embriones para transferir basándonos en el ránking del DANA y una tercera fase prospectiva con 147 embriones en la que las divisiones se anotaron automáticamente y se selecciona en base al ranking.

RESULTADOS

En la primera fase se analizaron los valores de UDA de 1021 embriones de implantación conocida. Los embriones se clasificaron en 5 categorías en función de su valor UAD (A: UAD < 0.5, B: UAD = 0.5 -1.0 C: UAD = 1.0-3.0 and D: UAD $\geq$ 3.0). Las tasas de implantación obtenidas de los 5 grupos fueron A 34%, B 25%, C 24% and D 19%. Estos resultados fueron comparables con los obtenidos tras la clasificación descrita en el algoritmo publicado por Basile en 2015 y con la clasificación morfología ASEBIR en día 3 de desarrollo.

En el segundo estudio, se analizaron los valores UAD de 261 embriones transferidos. Los embriones KID se distribuyeron en 3 categorías con las siguientes tasas de implantación Alta: 55%, Media: 46%, Baja: 33% ($p<0.05$). La tasa de embarazo evolutivo subió del 39% al 50% cuando la paciente recibió al menos un embrión con implantación alta.

En el tercer estudio se analizaron los valores UAD de 147 embriones transferidos cuyas anotaciones se hicieron de manera automatizada. La UAD media de los embriones que implantaron correctamente fue 1.13. Los embriones KID se distribuyen en estos 4 grupos A: UAD= 0.50, B: UAD = 0.50-0.66 C:UAD = 0.66-1.03 D: UAD >1.03. Las tasas de implantación en cada grupo fueron A: 50%, B: 48%, C: 41% y D: 25% ($p<0.05$).

CONCLUSIONES

El uso del análisis morfocinético bidimensional evita la variabilidad entre embriólogos y mejora la selección de embriones dentro de una cohorte con un mayor potencial de implantación. Así blastocistos con UAD >1.03 tienen significativamente una menor tasa de implantación que blastocistos con UAD <1.03. La selección de blastocistos según UAD, nos permitiría mejorar los resultados clínicos.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-044: INFLUENCIA DE LA CALIDAD SEMINAL EN LA CINÉTICA EMBRIONARIA

I. Martinez Arcos, M.J. López Rubira, J. Códesido López
IRAGA. Santiago de Compostela, La Coruña

INTRODUCCIÓN

Una de las principales dificultades de la embriología clínica es la selección del embrión con mayor poder de implantación para la transferencia. Recientemente se han desarrollado diferentes técnicas innovadoras como la metabolómica, genómica, proteómica y el time lapse para resolver este problema.

El método basado en el análisis de los parámetros morfocinéticos del embrión proporciona una medida objetiva y cuantitativa de su desarrollo, lo que permite distinguir embriones de buen pronóstico mediante el uso de algoritmos.

Uno de los problemas que presenta la selección de los embriones a través de la morfocinética es el hecho de que la división embrionaria puede variar en respuesta a la influencia de diversos factores. Algunos de estos factores ya han sido estudiados por distintos autores como son la edad materna, el tipo de cultivo embrionario, la estimulación ovárica...sin embargo muy pocos estudios han analizado el factor seminal y su influencia en la cinética embrionaria.

OBJETIVO

El estudio de la cinética del embrión está siendo implementado en la mayoría de los laboratorios de fecundación in vitro. Por ello es de gran importancia conocer los factores que pueden modificarla.

Utilizando esta tecnología, hemos querido determinar el efecto del semen sobre los marcadores tempranos de la cinética embrionaria.

	División directa	CC2 < 11,9 horas	S2<0,76 horas
Semen No alterado	4,9%	82,1%	24,2%
Semen alterado	10,3%	73,8%	15,3%
Estadístico exacto de Fisher (unilateral) p-valor	0,45	0,41	0,28

MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó un estudio retrospectivo de un total de 341 embriones obtenidos de un total de 37 pacientes menores de 35 años con función reproductora normal. Se dividieron en dos grupos en función de si el semen fue diagnosticado como normal o alterado y se analizaron mediante el uso de Time Lapse las variables citocinéticas tempranas más importantes (CC2, S2) y también si tuvieron o no división directa.

RESULTADOS

Se encuentran diferencias significativas entre los dos grupos en las tres variables analizadas (CC2, S2 y división directa)

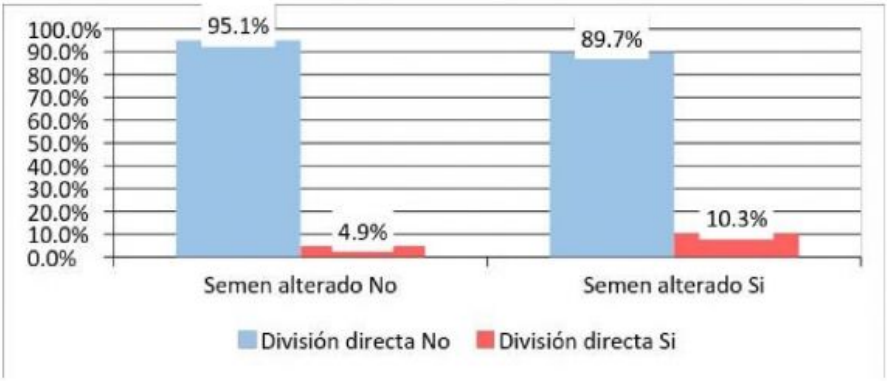
Cuando analizamos el porcentaje de embriones que se encuentran en el rango óptimo de CC2 y S2 observamos diferencias significativas entre semen es alterados y sémenes no alterados.

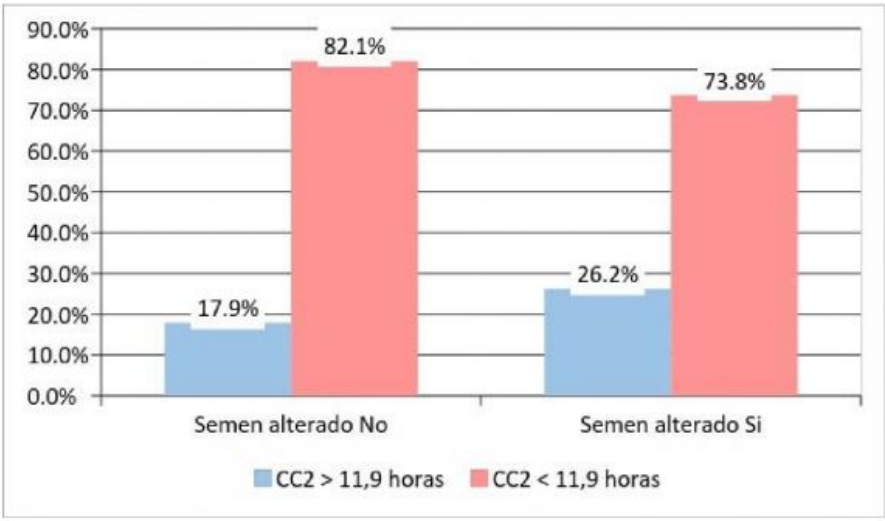
CONCLUSIONES

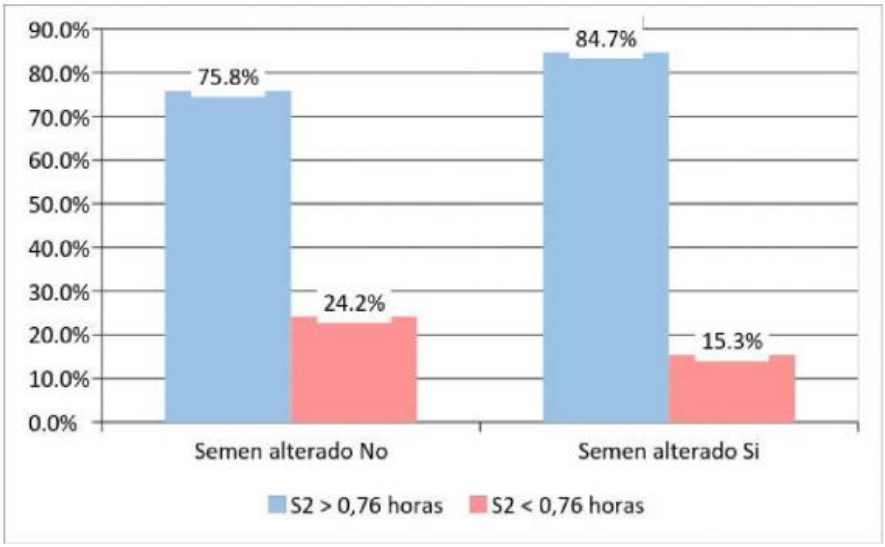
En este estudio hemos analizado las variables cinéticas tempranas del embrión que se usan para determinar el mayor porcentaje de implantación y de desarrollo a blastocisto y según los datos que hemos obtenido parece que existe una influencia del semen en las variables cinéticas analizadas.

Tras este diseño seguimos analizando datos para tener una mayor potencia estadística y al mismo tiempo consideramos importante estudiar dentro de las anomalías seminales cuáles son las más determinantes en la cinética del embrión.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2







Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-045: EL USO DE OVOCITOS MADURADOS IN VITRO ESPONTÁNEAMENTE NO AUMENTAN LAS TASAS DE EMBARAZO EN LOS CICLOS DE FIV

T. García Martínez (1), N. Toledo Riera (2), R. Noblom Artigues (2), A. Busquets Bonet (2)
(1) Universidad Autónoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Barcelona, (2) Quirón Salud- Centro Médico Teknon, Barcelon

INTRODUCCIÓN

La maduración ovocitaria es un proceso complejo que comprende tanto la maduración nuclear como la maduración citoplasmática. Ambas contribuyen a la adquisición de la competencia meiótica del ovocito para ser fecundado y dar lugar a un embrión viable.

Tras la denudación, en el laboratorio de Fecundación In Vitro (FIV) es habitual encontrar ovocitos en estadio de Metafase I (MI) que progresan a estadio de Metafase II (MII) de manera espontánea. Estos ovocitos pueden ser microinyectados con la intención de generar mayor número de embriones y así poder aumentar las posibilidades de embarazo de los pacientes.

OBJETIVO

Este trabajo tiene como objetivo valorar el potencial de los ovocitos MI que maduran espontáneamente en el laboratorio de FIV para aumentar la cohorte embrionaria y así aumentar las posibilidades de embarazo.

MATERIAL Y MÉTODO

En este estudio retrospectivo se incluyeron 79 pacientes sometidas a ciclo de FIV entre enero de 2014 y marzo de 2016, con una media de edad de 36,23 ± 4.39. Los ovocitos recuperados mediante aspiración ovárica (678 ovocitos), se separaron tras la denudación según sus diferentes estadios de maduración. Por un lado, con los MII (356 ovocitos) se siguió el protocolo habitual de inseminación (Inyección Intracitoplasmática de Esperma, ICSI) y por otro lado, los MI que maduraron In Vitro durante las 5 primeras horas de cultivo (127 ovocitos) se sometieron a la misma técnica conformando así el grupo de estudio. Se evaluaron parámetros como la tasa de fecundación, calidad embrionaria, número de embriones evolutivos, tasa de embarazo y de implantación en ambos grupos.

RESULTADOS

Se observó una tasa de fecundación más baja estadísticamente significativa en ovocitos madurados In Vitro (64,89% vs 33,07%; $p<0.001$). La proporción de embriones evolutivos fue similar en ambos grupos (51.95% vs 52,38%), sin embargo, en el grupo de estudio se vio menor calidad embrionaria y en ningún caso hubo embarazo (14,46% vs 0%).

CONCLUSIONES

La maduración In Vitro de ovocitos MI genera ovocitos con baja capacidad para ser fecundados y, los que fecundan, dan lugar a embriones de peor calidad y con muy bajo potencial de implantación. Por lo tanto, el uso de ovocitos madurados espontáneamente en tratamientos de FIV no aumenta las posibilidades de embarazo.

Para evitar el uso de este tipo de ovocitos, los laboratorios deberían tener presente los timings de denudación. En un futuro sería interesante valorar si se favorece la maduración citoplasmática de los ovocitos manteniéndolos más tiempo con el cúmulo.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-046: ¿ES EL RATIO ENTRE DIÁMETRO Y MCI DEL BLASTOCISTO UN BUEN PRONÓSTICO DE EMBARAZO?

A. Rabanal Anglada, M. Grossmann Camps, C. Selva Viñals, C. Guix Galcerán, R. Olivares Vela, O. Serra Ortiz, L. Zamora Corzo
Barcelona IVF, Barcelona

INTRODUCCIÓN

Poder encontrar un parámetro para elegir el blastocisto con mejor tasa de implantación es el objetivo que perseguimos los profesionales que trabajamos en centros de reproducción asisitida.

OBJETIVO

El objetivo del estudio es encontrar un parámetro en relación a la masa celular interna y el trofoectodermo del blastocista que se correlacione con la tasa de implantación en SET en pacientes receptoras de ovocitos.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio retrospectivo de 61 pacientes que se encuentran en el programa de donación de ovocitos y parámetros seminales normozoospérmia. En todos los casos la única causa de esterilidad fue un problema ovocitario. Se transfirió un único blastocisto de buena calidad (SET).

Ambos grupos son comparables en cuanto a edad e IMC de la mujer.

Los ciclos de las receptoras se sincronizaron con la estimulación de la donante para realizar la transferencia de los embriones en fresco. La preparción endometrial se realizó con Valerato de Estradiol (8 mg/día) y Progesterona micronizada (600 mg/día) En todos los ciclos la transferencia se realizó en dos tiempos bajo control ecográfico.

Tras la obtención de los óvulos de la donante, se realizó microinyección en todos los ovocitos MII. Los embriones que presentaron 2PN/2CP se cultivaron en medios secuenciales (Vitrolife G-Series ©) hasta D+5 de desarrollo embrionario. Se valoró gracias al sitema time-lapse (Embryoscope) el área que ocupaba la masa celular interna (MCI) en blastocistos cuyo diámetro estuviera comprendido entre 180-200 µm. Se estudió la relación entre el embarazo evolutivo y estos dos parámetros así como también con el cociente entre el diámetro y la MCI (Q).

Se realiza estudio estadístico mediante T-test con α=0.05.

RESULTADOS

No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los dos grupos en cuanto al n º de ovocitos totales, nº de ovocitos MII, nº de embriones en estadio de 2PN ni en el nº de blastocistos totales.

Cuando se valoró la tasa de gestación e implantación en cada grupo, los resultados no mostraron diferencias significativas.

CONCLUSIONES

No es posible relacionar la tasa de gestación con el diámetro del blastocisto, ni con el área que ocupa la masa celular interna. Tampoco es posible relacionarla con un parámetro conjunto Q definido como cociente entre el área de la masa celular interna y el diámetro del blastocisto. Serán necesarios el estudio de otros parámetros relacionados con la morfocinética que nos ayuden a determinar el blastocisto con mejor tasa de implantación.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-047: ESTUDIO COMPARATIVO DE ALGUNOS COMPONENTES DEL FLUIDO FOLICULAR Y DEL PLASMA SEMINAL II: ACTIVIDAD DNASA

J. Bartolomé Nebreda (1), P. Sánchez Martín (2), M. Dorado Silva (3), C. López Fernández (1), F. Sánchez Martín (2), J. Gosálvez Berenguer (1)
(1) Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, (2) Ginemed Sevilla, (3) Ginemed Huelva

INTRODUCCIÓN

En el plasma seminal (PS) de mamíferos, se ha descrito cierta actividad DNasa cuya función fisiológica se desconoce. Se ha especulado con la posibilidad de que se asocie con fertilidad, dado que esta enzima participa en la fragmentación del ADN. En el ganado vacuno, se ha comprobado que la actividad DNasa del PS no es igual entre diferentes individuos, pero se desconoce si el mismo fenómeno ocurre en humanos. Por otra parte, no se ha estudiado si en el fluido folicular (FF) existe también una actividad DNasa equivalente a la que se ha descrito en el caso del PS.

OBJETIVO

i. Analizar si existen diferencias entre individuos en la actividad DNasa presente en el PS.

ii. Determinar la presencia de actividad DNasa en el FF.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio prospectivo que incluye eyaculados de 10 pacientes elegidos al azar. El eyaculado se centrifugó a 300xg durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante. Este se centrifugó a 1000xg durante 10 minutos para asegurar la ausencia de espermatozoides. Los PSs procesados se alicuotaron y se almacenaron a -20ºC. Los espermatozoides obtenidos en la primera centrifugación se utilizaron para el aislamiento del ADN genómico.

De forma paralela se analizaron 10 muestras de FF sin ningún criterio de inclusión previo. Los FFs se aislaron del primer folículo seleccionado y se centrifugaron a 1000xg durante 20 minutos para eliminar restos celulares. Los sobrenadantes se alicuotaron y se almacenaron a -20ºC hasta la determinación de la actividad DNasa.

Para el análisis de la actividad DNasa se incubaron 10µl de PS o FF con 1µg de ADN genómico a 37ºC y a 20ºC durante 1h. Para determinar la cinética de la actividad DNasa, los diferentes PSs y FFs se incubaron con ADN genómico a 37ºC durante 15, 30 y 60 min. Posteriormente, las muestras se trataron con fenol: cloroformo y los sobrenadantes se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% (tinción con Gel Red y visualización con luz ultravioleta).

Para confirmar que la actividad DNasa estaba asociada a proteínas, los PSs y los FFs se trataron con Proteinasa K a 56ºC durante 1hr. Posteriormente, los sobrenadantes se trataron con fenol: cloroformo y se incubaron con ADN genómico en las condiciones descritas anteriormente. De forma paralela, las muestras se inactivaron por calentamiento a 90ºC durante 15 minutos y se analizó la persistencia de la actividad DNasa.

RESULTADOS

En las 10 muestras de PS se detectó actividad DNasa variable y asociada a cada individuo. Existen muestras con una alta actividad DNasa que degradaba por completo el ADN genómico mientras en otros PS la actividad era muy baja. La actividad DNasa del PS se incrementa con el tiempo de incubación y era mayor a 37ºC que a 20ºC, indicando que esta actividad es tiempo y temperatura dependiente.

En el caso de los FF no se detectó actividad DNasa en ninguno de los casos estudiados.

Finalmente, la digestión previa con Proteinasa K así como la incubación de las muestras a 90ºC inactivaban la actividad DNasa demostrando que esta es de naturaleza proteica.

CONCLUSIONES

El PS humano contiene una/s proteína/s con actividad DNasa variable y asociada a cada individuo capaz/es de digerir ADN desnudo en periodos relativamente cortos de tiempo (15-30 min). La intensidad de digestión es tiempo y temperatura dependiente. Por el contrario, los FFs no presentan ninguna actividad DNasa. La actividad DNasa asociada al PS podría relacionarse con la dinámica de fragmentación del ADN del espermatozoide. Las implicaciones en fertilidad de esta respuesta diferencial de actividad DNasa deben ser analizadas en futuros estudios.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-048: LOS VARONES PORTADORES DE UNA INVERSIÓN EN EL CROMOSOMA 9 XYINV(9) NO PRESENTAN VARIACIÓN EN LOS PARÁMETROS DEL ESPERMIOGRAMA RESPECTO A VARONES XY

A. Colom Rivero (1), R. Blanes Zamora (2), J. González Pérez (2), R. Vaca Sánchez (2), C. Concepción Lorenzo (2), R. Rodríguez Díaz (2), A. Fernández Rodríguez (2), S. Hess Medler (3), D. Báez Quintana (2)
(1) Master de Reproducción Humana TP Universidad de La Laguna, La Laguna, Tenerife, (2) URH. Hospital Universitario de Canarias, La Laguna, Tenerife, (3) Universidad de La Laguna, Tenerife

INTRODUCCIÓN

Los factores masculinos involucrados como causa de infertilidad en las parejas que acuden a centros de reproducción comprenden 30-50% del total, de modo que su análisis es un tema de relevancia para el estudio de estas parejas. Una de las causas de infertilidad puede ser de tipo cromosómico, y sabemos que a diferencia de las delecciones y duplicaciones, las inversiones cromosómicas no cambian la cantidad de material genético del cromosoma.

Se estima que la incidencia de la inversión pericéntrica del cromosoma 9 en la población general es del 1%. Sabemos que dentro de la población infértil tenemos una mayor incidencia de casos de inversión del cromosoma 9 (XYinv(9)) que en la población general y por tanto queremos saber si está relacionada con una mayor frecuencia de alteraciones del espermiograma.

OBJETIVO

Es nuestro objetivo comparar dentro de un grupo de pacientes de nuestra unidad de reproducción asistida a los que se les ha realizado el estudio del cariotipo, cuál es la incidencia de inversión del cromosoma 9 así como determinar comparativamente si hay diferencias entre los dos grupos en cuanto al resultado del espermiograma.

MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó estudio retrospectivo de los pacientes de nuestra unidad entre los años 2008-2016 a los que se les hubiera solicitado el estudio del cariotipo por FISH . Se consiguió un grupo de 641 varones con cariotipo conocido de los que 576 fueron XY y 65 fueron XYinv(9). Se desestimaron aquellos varones con alteraciones cromosómicas distintas de esta inversión. Se realizó el estudio de los espermiogramas analizados para estos varones y se aplicó las tablas de contingencia con test de x2 con un nivel de confianza del 95%.

Según el presente estudio, observamos que en nuestra población de varones infértiles existe una incidencia de inversión del cromosoma 9 superior al que se describe para la población general. Concretamente en este grupo estudiado es del 10%. Sin embargo, al comparar los espermiogramas de los dos grupos de pacientes no encontramos diferencias

Grupo	Normozoospermia	Oligoasteno-zoospermia	Astenozoospermia	Azoospermia	Criptozoospermia	Astenoterato-zoospermia
46XY N=576	50,30%	29,20%	11,50%	1,40%	7,50%	0,20%
46XYinv(9) N=65	40,00%	27,70%	23,10%	0,00%	9,20%	0,00%

RESULTADOS

P=0,117 (NS)

CONCLUSIONES

Aunque el portador de una inversión puede ser completamente normal, tiene un riesgo ligeramente mayor de producir un embrión con un desequilibrio cromosómico. Esto se debe a que un cromosoma invertido tiene dificultad de emparejarse con su homólogo normal durante la meiosis, lo que puede producir gametos que contengan derivados cromosómicos desequilibrados si ocurre un entrecruzamiento desigual (1), esto y que esta inversión podría tener efectos variables sobre la espermatogénesis, desde la azoospermia hasta la morfología severa de los espermatozoides, la motilidad y la segregación meiótica (2) nos llevó a realizar este estudio retrospectivo de nuestros pacientes en nuestra Unidad de Reproducción .

estadísticamente significativas con respecto a la valoración del espermiograma, de manera que si hay algún factor añadido de infertilidad en estos pacientes, éste no se ve reflejado en el espermiograma convencional.

BIBLIOGRAFÍA

1.- A. Fierro Urturi1, M. Mata Jorge, M. Sanz Fernández. Inversión pericéntrica del cromosoma 9 en una niña con talla baja: dilemas diagnósticos. Acta Pediatr Esp. 2012; 70(2): 52-56.

2.-Collodel G, Moretti E, Capitani S, Piomboni P, Anichini C, Estenoz M, Baccetti B. TEM, FISH and molecular studies in infertil mon with pericentric inversion of chromosome 9. Andrología 2006 Aug; 38(4):122-7.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-049: LOS VARONES CON FISH EN ESPERMATOZOIDES ALTERADO GENERAN MAYOR NÚMERO DE EMBRIONES CON MONOSOMÍAS

A. Sáez Cuevas, E. García Mengual, J. Descals Ferrando, JC. Triviño Pardo, R. Bautista Llácer, M. Pardo Belenguer, A. Oller Campillo, A. Catalá Belenguer, X. Vendrell Monton
Sistemas Genómicos, Paterna, Valencia

INTRODUCCIÓN

Durante la última década el estudio de la aneuploidía espermática mediante hibridación in situ fluorescente (FISH) ha cobrado especial relevancia en la valoración del varón infértil, ya que proporciona un valor pronóstico sobre la aneuploidía embrionaria. Los espermatozoides son células haploides que poseen una única copia de cada cromosoma. Errores en la meiosis durante la espermatogénesis pueden dar lugar a espermatozoides con nulisomía, disomía o diploidía. Es por ello que, la probabilidad de generar un embrión aneuploide aumenta cuanto mayor es la proporción de espermatozoides aneuploides en el eyaculado. Un espermatozoide nulisómico podría dar lugar a monosomías en el embrión mientras que uno disómico generaría embriones con trisomías.

OBJETIVO

Determinar la frecuencia de la aneuploidía embrionaria (monosomía y trisomía) en ciclos de ICSI-DGP cuya indicación es FISH en espermatozoides alterado.

MATERIAL Y MÉTODO

Se analizó de forma retrospectiva la frecuencia de monosomías y trisomías en embriones procedentes de ciclos de ICSI-DGP (tanto en D3 como en D5) en dos grupos de estudio: grupo 1 (FISH en espermatozoides alterado y ovodonación) y grupo 2 (varones normozoospérmicos y semen de donante).

Todos los embriones fueron analizados mediante hibridación genómica comparada (aCGH). La amplificación, 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 datos se analizaron mediante un test binomial utilizando el programa informático R statistical platform. Las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Se analizaron 327 embriones procedentes de 47 ciclos de del grupo 1, de los cuales se obtuvo diagnóstico de 295 (90,2%). De éstos, 203 fueron aneuploides (68,8%). Se encontró un total de 576 aneuploidías, con una media de 2,8 aneuploidías por embrión, de las cuales 276 (47,9%) eran trisomías y 300 (52,1%) monosomías. En el grupo 2 se analizaron 1732 embriones de 334 ciclos, de los cuales 1531 fueron diagnosticados (88,4%). De éstos 1215 resultaron aneuploides (79,4%). Se detectaron 3831 aneuploidías, con una media de 3,2 por embrión, de las cuales 2015 (52,6%) eran trisomías y 1816 (47,4%) monosomías.

El análisis estadístico de estos datos revela significancia estadística entre la proporción de monosomías de ambos grupos.

CONCLUSIONES

Los varones con FISH en espermatozoides alterado generan embriones con mayor número de monosomías, lo que sugiere que valorar la nulisomía cuando se estudia la aneuploidía espermática mediante FISH es importante.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-050: CICLO NATURAL EN PACIENTES MAYORES DE 39 AÑOS: RESULTADOS DE LABORATORIO

J. Iglesias Rodríguez-Aguilar, I. Carreño Pérez, B. Castro Martín, L. Seco Blanco, R. Vázquez Agüero, E. Cruz Cruz, A. Bermejo de la Calzada.
Clínica Minifiv, Madrid

INTRODUCCIÓN

Los ciclos de fecundación in vitro (FIV) en los que se aprovecha el ciclo natural (CN) de la paciente se han convertido en una alternativa a los protocolos de estimulación ovárica controlada (EOC), siendo una opción más económica y sencilla.

OBJETIVO

El objetivo es analizar los resultados clínicos y de laboratorio obtenidos en nuestro centro en los 195 ciclos realizados en ciclo natural puro en pacientes mayores de 39 años de edad.

MATERIAL Y MÉTODO

Análisis retrospectivo de 195 ciclos naturales realizados entre septiembre de 2013 y mayo de 2016.

El primer control ecográfico se realizó entre el día 6 -10 de ciclo. No se introdujo ningún tipo de medicación para la estimulación ovárica, por lo que sólo se llevó a cabo un seguimiento ecográfico cada 48-72 h hasta objetivar un folículo dominante > 16 mm. Una vez alcanzado este tamaño, se indujo la maduración ovocitaria con 0,2 mg de triptorelina. La aspiración de los folículos tuvo lugar a las 36 h de la maduración ovocitaria mediante punción vaginal ecoguiada. La microinyección espermática (ICSI) de los ovocitos maduros se llevó a cabo a las 3 h de la punción, valorando la fecundación a las 17-20 h de la misma. Para el soporte de fase lútea se utilizaron 200 mg cada 12 h de progesterona micronizada por vía vaginal. La transferencia se realizó en el día 2 o día 3 de desarrollo embrionario, se ofreció cultivo secuencial en estadio de blastocisto en pacientes con fallo de implantación previo o calidad dudosa en las primeras 72 h de evolución (Grafica 1).

Analizamos los resultados obtenidos en los parámetros de fecundación, y tasa de gestación (por ciclo, punción y transferencia). Comparamos nuestros resultados con los del registro de SEF de 2014.

RESULTADOS

Se realizaron un total de 195 ciclos. La media de edad fue de 42,3 años, la concentración de FSH media de 11,7 mU / mL y el número de ciclos previos de FIV sin éxito son de 1,7. En los 65 ciclos en que se alcanzó la punción (33,3 %) se obtuvo una media de 1 ovocito por punción, con una tasa de fecundación del 72,9 %. En 49 de los 195 ciclos se realizó transferencia embrionaria (25%), con una tasa de implantación del 22,4 %. Analizados globalmente, las tasas de embarazo fueron del 7 % por ciclo iniciado, 21 % por punción y 28,6 % por transferencia (Tabla 1).

CONCLUSIONES

Nuestros resultados, a pesar del uso de un protocolo en el que se recupera 1 ovocito de media, son comparables a los del último registro de la SEF publicado del año 2014 (Registro de la SEF. 2014), en el que la tasa de embarazo en pacientes mayores de 39 años es del 12,7% por ciclo iniciado, del 14,8% por punción, y del 22,7% por transferencia (Grafica 2).

Uno de los puntos en contra de los ciclos de FIV realizados en ciclo natural es la alta tasa de cancelación (>70%) lo cual puede ser inaceptable para muchas pacientes y profesionales. Sin embargo, analizando los resultados obtenidos por punción y transferencia, suponen una alternativa simple, económica y poca agresiva.

Es evidente que los protocolos de CN puro no pueden competir con la estimulación convencional en cuanto a tasa de embarazo por ciclo iniciado. Quizá el debate deba centrarse en si existen alternativas más seguras, sencillas y económicas a la EOC para un subgrupo de pacientes en las que los tratamientos convencionales no aumentan la rentabilidad del ciclo.

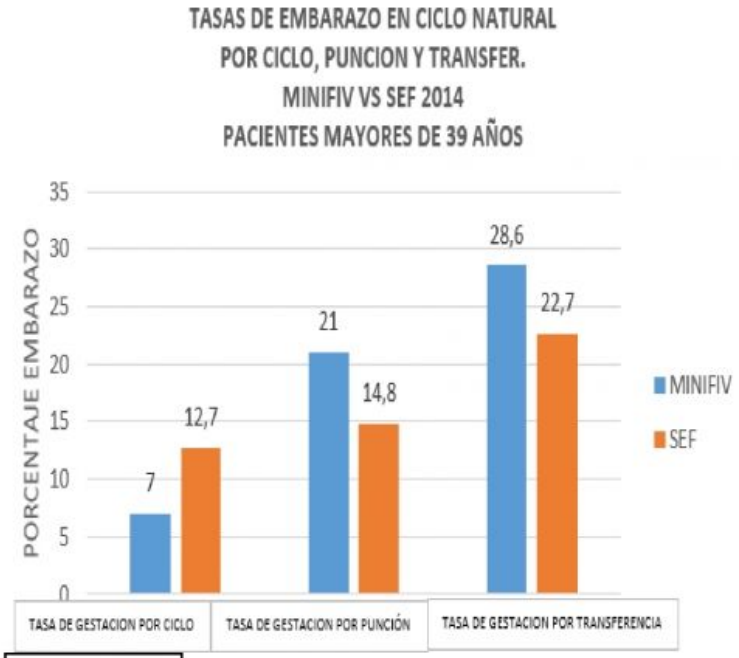
Individualizando el tratamiento de cada paciente, y explicando las diferentes alternativas, con las ventajas e inconvenientes de cada protocolo, el ciclo natural parece ser una opción válida y con posibilidades reales de embarazo.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

Grafica 1.

	RESULTADOS
Nº de ciclos iniciados (n)	195
Media de edad (años)	42,3
Media FSH basal (mUI/mL)	11,7
Media FIV previas (n)	1,7
Ciclos cancelados (%)	74,9%
Total de punciones (%) (n)	33,3% (65)
Total de transferencia (%)(n)	25% (49)
Nº de ovocitos recuperados por punción (n)($\bar{X}$)	N=151 $\bar{X}$=1,1
Nº de ovocitos MII por punción ($\bar{X}$)(%)	N=118 $\bar{X}$=1
Tasa de fecundación (%)	72,9
Ciclos con transferencias por ciclo iniciado (%)	25%
Ciclos con transferencias por punción (%)	75%
Nº de embriones transferidos por transferencia ($\bar{X}$)	1,2
Tasa de gestación por ciclo iniciado (%) gestaciones/ciclos iniciados	7% (14/195)
Tasa de gestación por punción (%) gestaciones/ciclo iniciado	21% (14/65)
Tasa de gestación por transferencia (%) gestaciones/transferencia	28,6% (14/49)
TOTAL sacos gestacionales (n)	13
TOTAL EMBRIONES TRANSFERIDOS	58
Tasa de implantación (%)	22,4%

Tabla 1.



Grafica 2.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-051: ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS RESULTADOS CLÍNICOS DE LA ICSI UTILIZANDO ESPERMATOZOIDES PROCEDENTES DE SEMEN DE DONANTE, DE BIOPSIAS TESTICULARES Y DE EYACULADOS DE VARONES CON OLIGOASTENOTERATOZOOSPERMIA SEVERA, MODERADA Y NORMALES

I. Molina Botella (1), J.V. Martínez Sanchis (1), B. Durán López (1), L.B. Serralta García (1), S. Arroniz Echeverría (1), P. Abad Gómez (1), S. Balasch Aparisi (2)
(1) Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia (2) Universitat Politècnica, Valencia

INTRODUCCIÓN

Con la aparición de las técnicas de reproducción asistida (TRA), la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) ha supuesto un punto de inflexión en el tratamiento de la infertilidad masculina severa. Los resultados de la ICSI pueden estar influenciados por diversos factores incluyendo la calidad de la muestra seminal, edad y reserva ovárica de la mujer. La influencia de la calidad seminal sobre los resultados de la ICSI, a día de hoy, permanecen inciertos.

OBJETIVO

Evaluar los resultados clínicos de la ICSI en función del origen y de la calidad de los espermatozoides utilizados.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio retrospectivo de cohortes en el que se evaluaron 3179 ciclos realizados desde Enero de 2010 hasta Diciembre de 2015 en la Unidad de Reproducción del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia. Para evitar sesgos asociados a los efectos de la edad de la mujer y del número de embriones transferidos solamente se incluyeron aquellos casos de mujeres menores de 36 años y con transferencia de dos embriones. Se establecieron seis grupos según la calidad seminal: 222 con espermatozoides procedentes de eyaculados con oligoastenoteratozoospermia (OATZ) severa (Concentración

RESULTADOS

Solo se observaron diferencias significativas para la TF (p=0.0045). Las mayores TF se obtuvieron con OATZ moderada (56%) y las menores con espermatozoides procedentes de testículo (48%). La CE fue muy similar en todos los grupos (p= 0.2772). La TI no presentó diferencias significativas (p= 0.8165); la TG tampoco presentó diferencias significativas (p=0.9319), aunque las mayores TG se obtuvieron con espermatozoides procedentes de testículo (42%) y las menores con OATZ moderada (36%). Las mayores TA se observaron en los eyaculados normales (16,9%) y las menores con OATZ severa (9,5%). Las TRNV por transferencia tampoco presentaron diferencias significativas (p=0.5090).

CONCLUSIONES

En nuestro grupo de estudio no hay evidencias de diferencias significativas en los resultados clínicos en términos de calidad embrionaria, tasas de implantación, gestación, abortos y recién nacidos vivos en función del origen y de la calidad de los espermatozoides utilizados. Por lo tanto, en las condiciones en las que se ha realizado nuestro estudio no estaría justificado la indicación de semen de donante en los casos de una OATZ severa y/o biopsia de testículo (BT) con espermatozoides disponibles para su posterior microinyección. Además, en los casos de OATZ severa tampoco estaría justificada la realización de la BT siempre y cuando tengamos espermatozoides móviles procedentes del eyaculado.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-052: OOCYTE DIAMETER AS A NON-INVASIVE INDICATOR OF OOCYTE DEVELOPMENTAL COMPETENCE

N. Grau Grau, N. Soler Balaguer, L. Escrich Albelda, D. Pabón Realpe, L. Romany Sevilla, B. Aparicio Ruiz, J.M. de los Santos Molina, V. García-Láez Moreno, A. Mifsud Giner, M.J. Escribá Pérez
IVI-Valencia, Valencia

INTRODUCTION

The oocyte competence is a misunderstood process of the meiosis that give rise to reproductively useful oocytes. During folliculogenesis, when the primary oocyte undergoes substantial growth, gene transcription and the subsequent stabilization of de novo transcripts enable the storage of large quantities of mRNA for subsequent utilisation by the fertilized zygote during early development. The presence of sufficient stock of mRNA in secondary oocytes determines their competence to develop embryos until the maternal-zygotic transition and beyond.

In mice, one study showed that largest oocytes have more quantity of mRNA than the others; however, this fact was not positively related to the developmental competence.

OBJECTIVES

To explore, in humans, whether the oocyte size is related to the fertilization rate and type and whether the oocyte size could also be related to the ability of correctly fertilized oocytes to progress in vitro to the blastocyst stage.

MATERIAL AND METHODS

This is a retrospective study performed on oocytes, pertaining to our ovum donation program in which ICSI and subsequent culture to the blastocyst stage in a time-lapse incubator were done.

Immediately after ICSI, microinjected oocytes were individually cultured in the time-lapse incubator (Embryoscope®) until day 5 or 6 of development. Retrospective image analysis of recently microinjected oocytes allowed us to easily measure the oocyte diameter and to assess the fertilization in every sized oocyte. At 18-20 h after microinjection, oocytes could be correctly, incorrectly or non-fertilized whereas others degenerated were excluded of the study. After tracking the in vitro development of such sized oocytes, the ability of those correctly fertilized oocytes to progress or not to the blastocyst stage was also assessed.

Description of the sample according to oocyte diameter, fertilization rate and type and to the ability to progress to the blastocysts stage was done. Comparison of the oocyte diameters according to both, the fertilization type and the ability of correctly fertilized oocytes to progress to the blastocyst stage were also done.

RESULTS

A total of 211 out of 223 oocytes, initially included in this study, were sized. The remaining 12 oocytes were excluded of the study for being lysed after ICSI (5.4%).

Oocyte diameters, sized in 211 oocytes, ranged from 98.7µm to 123.3µm (mean: 112.0±3.7µm).

The percentage of correctly, incorrectly and non-fertilized eggs were 77.5%, 4.9% and 12.1%, respectively. One-hundred and thirty-one out of 173 correctly fertilized oocytes (58.7%) progressed to the blastocyst stage.

The type of fertilization was not related to the diameter of the oocyte (p=0.68). Comparison of the oocyte diameters between those zygotes that progressed or not to the blastocysts stage did not show significant differences (p=0.06). However, after distributing the oocyte diameters into deciles, we observed that those oocytes sized ≤109.0µm or >117.0µm in diameter, progressed to the blastocyst stage at lower rate than those oocytes with diameters ranged from 109.1µm to 117µm (65.4% vs. 80.2%; p=0.04), being more detrimental at sizes ≤107.3µm (42.9% vs. 78.6%; p=0.003).

CONCLUSIONS

Our data suggested that oocyte undergrowth and overgrowth may affect the oocyte ability to support development to blastocyst. It is plausible that smaller oocytes could have incomplete oogenesis whereas larger oocytes could be originated from follicles that have undergone some levels of atresia after having peaked during folliculogenesis.

Although more data are required to validate these initial observations and additional research, based on mRNA analysis, is required to complete them, the results presented encourage us to propose the easily measurement of the oocyte diameter, as a non-invasive parameter to be added to the list of markers (cleavage kinetics, follicle size, age of the oocyte donor and cumulus-oocyte complex morphology) associated with oocyte developmental competence.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-053: IMPACTO DE LA MULTINUCLEACIÓN EN ESTADIO DE DOS CÉLULAS EN EL POTENCIAL DE IMPLANTACIÓN Y RIESGO DE ABORTO

S. Arrones Olmo, A. Genovés Pérez, I. Martínez Rodero, C. Olmedo Illueca, M. Barea Gómez, S. Royo Bolea, L. Abad de Velasco, A. Morales Vicente, I. Cuevas Saiz
Hospital General Universitario de Valencia, Valencia

INTRODUCCIÓN

La incorporación de los sistemas time-lapse a la rutina de trabajo de los laboratorios de embriología ha permitido la incorporación de nuevos marcadores de selección embrionaria, no valorables anteriormente con la morfología convencional. Entre ellos se ha propuesto la multinucleación de las blastómeras en estadio de 2 células. Basándonos en la bibliografía, esta multinucleación puede estar relacionada con anomalías cromosómicas y mayor incidencia de aborto. Además, se ha reportado un efecto negativo en la implantación. Sin embargo, mediante tecnología time-lapse se ha visto que casi la mitad de los embriones están multinucleados en estadio de dos células, lo cual hace replantearse su repercusión en el desarrollo embrionario normal. En esta línea, hay estudios que defienden que la multinucleación en dos células es reversible en la mayoría de los casos y que no tiene impacto en la tasa de implantación.

OBJETIVO

Estudiar el efecto de la multinucleación en embriones humanos en estadio de dos células sobre el desarrollo morfocinético in vitro, la tasa de implantación y la tasa de aborto.

MATERIAL Y MÉTODO

Se analizaron retrospectivamente 323 embriones de los que se conoce su estatus implantatorio, cultivados en el incubador MIRI-TL® en medio Continuous Single Culture Complete (Irvine®). Dicho análisis consistió en comparar las tasas de implantación y aborto de embriones según presentaban o no multinucleación en estadio de dos células. Los datos se analizaron con el paquete estadístico SPSS 15.0 y el estadístico de contraste utilizado fue el test t-Student.

RESULTADOS

De los 323 embriones incluidos en el estudio, 76 presentaban multinucleación en estadio de 2 células (23,5%), 26 de los cuales resultaron en implantación positiva (KID+) y otros 50 en implantación negativa (KID-) (34,2% frente a 65,8%, respectivamente). De los 247 (76,5%) que no presentaron multinucleación alguna, 61 resultaron en KID+ (24,7%) y 186 en KID- (75,3%). No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en el estatus de implantación (KID+/KID-) de los embriones con multinucleación positiva respecto a los no multinucleados en este estadio (p-valor >0.05). En cuanto al aborto, no se encontraron diferencias significativas al comparar las tasas de aborto de los multinucleados en dos células, positiva (27,9%) y negativa (27,9%) (p-valor >0.05).

CONCLUSIONES

No se encontró correlación entre la presencia de multinucleación en estadio de dos células y el estatus de implantación, ni con la tasa de aborto de los embriones analizados. De acuerdo a nuestros resultados, parece razonable considerar que este criterio morfológico no resulta informativo a la hora de seleccionar embriones con mayor potencial de implantación o predecir el riesgo de aborto. No obstante, sería necesario aumentar el número de embriones analizados para confirmar esta información.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-054: VALOR PREDICTIVO DE LLEGADA A BLASTOCISTO E IMPLANTACIÓN MEDIANTE COMPARACIÓN DE PARÁMETROS MORFOCINÉTICOS: ESTUDIO DI-CÉNTRICO COMPARADO

A. Delgado Mendive, D. Castelló Salom, A. Tejera Pastor, M. Meseguer Escrivá
IVI VALENCIA, Valencia

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la transferencia única para evitar gestaciones múltiples, se ha convertido en uno de los objetivos prioritarios de los centros de reproducción asistida. Por lo tanto, la elección del embrión con mayor potencial de implantación tiene una gran importancia en los laboratorios de fecundación in vitro (FIV). La morfología convencional se ha visto complementada con la tecnología time lapse y el uso de los parámetros morfocinéticos. Mediante los mismos, ha sido posible identificar eventos embriológicos y marcadores que estuvieran relacionados con el desarrollo embrionario y los resultados clínicos.

OBJETIVO

Demostrar el potencial predictivo de los parámetros morfocinéticos que se utilizan para la selección embrionaria y su relación con la tasa de llegada a blastocisto y la tasa de implantación, así como la utilidad del uso de algoritmos en distintas clínicas con distintas condiciones de cultivo y estrategias clínicas.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio retrospectivo de dos bases de datos correspondientes a dos clínicas (A y B) de embriones cultivados hasta el estadio de blastocisto (n= 28.040), así como de la tasa de implantación tras transferencia única (I=846). Los embriones se cultivaron en un sistema time lapse (Embryoscope, Vitrolife, Sweden). Para el grupo A, (n=12.138; I=509) y para el B (n=15.902; I=479). Las variables estudiadas incluyeron: t2, t3, t4 hasta t9, así como la transición entre los distintos estadios. La comparación entre las dos bases de datos se hizo mediante el uso de cuartiles, sus límites los valores medios de cada cuartil con un intervalo de confianza del 95%, así como el área bajo la curva de los parámetros morfocinéticos respecto a la llegada a blastocisto e implantación.

RESULTADOS

Se estudiaron detalladamente t3, t5, cc2 (t3-t2), así como el ratio (t5-t3) y (t5-t2). Respecto al marcador mejor definido (t5), los timings no mostraron diferencias entre clínicas. Sin embargo, las proporciones de llegada a blastocisto en el grupo B se vieron ampliamente afectadas, en comparación con el grupo A. De igual manera, se observó un descenso significativo en la proporción de blastocistos con tiempos más largos a t5 para el grupo B. En cuanto a la tasa de implantación, t5 resultó más informativo en el grupo A. En la comparación de cc2 y el ratio (t5-t3) y (t5-t2), los resultados fueron similares para ambos grupos. Respecto a t3, los timings fueron significativamente mayores para el grupo A debido a la proporción de embriones implantados en el segundo cuartil (dentro del intervalo de confianza).

CONCLUSIONES

El uso algoritmos de selección embrionaria puede ser adecuado entre distintas clínicas, si bien los parámetros más sensibles pueden ser específicos de cada clínica y no deben ser aplicados universalmente. La evaluación de los resultados depende también de los parámetros evaluados y deberían ser validados antes de la incorporación de cualquier algoritmo de selección.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-055: SEX RATIO PRIMARIO EMBRIONARIO TRAS TRA Y DGP: ¿INFLUYEN LAS TRA SOBRE EL SEX RATIO PRIMARIO?

J. Descals Ferrando, E. García Mengual, A. Sáez Cuevas, R. Bautista Llácer, M. Pardo Belenguer, E. Raga Giner, A. Oller Campillo, A. Català Belenguer, J.C. Triviño Pardo, X. Vendrell Montón
Sistemas Genómicos, Paterna, Valencia

INTRODUCCIÓN

El sex ratio (SR) en la fecundación o sex ratio primario (SR1) se define como la proporción de embriones XY respecto del total. Existen pocos estudios que hagan referencia a este valor que suele ser desconocido, ya que requiere de una técnica de reproducción asistida (TRA) y un posterior diagnóstico genético preimplantacional (DGP). Por otro lado, el sex ratio en el nacimiento o sex ratio secundario (SR2) se define como la proporción de varones nacidos respecto a todos los nacimientos. Es el valor más empleado por las bases de datos posnatales, situándose en torno al 0,515 en la población general sin TRA.

OBJETIVO

El objetivo de nuestro estudio es comparar el SR1 tras TRA y DGP con el SR2 tanto de la población general como de la población tras TRA y DGP, y analizar el efecto de las TRA sobre el SR1.

MATERIAL Y MÉTODO

Se analizó retrospectivamente el sexo de 4032 embriones obtenidos a partir de 1191 casos de TRA y posterior biopsia en día 3 (D3) o día 5 (D5) para análisis de aneuploidías, tanto por arrays de hibridación genómica comparada (aCGH) como por Next generation Sequencing (NGS). Se registraron 189 nacidos de sexo conocido, 33 de ellos provenientes de gestaciones gemelares. Los embriones proceden de ICSI. Se realizó mediante un análisis binomial utilizando el paquete estadístico R. Las diferencias se consideran significativas cuando $P<0.05$.

RESULTADOS

Se analizaron 3500 embriones mediante DGP biopsiados en D3, obteniéndose 1896 XX y 1604 XY, siendo el SR de los diagnosticados en D3 SR1d3=0.458, de los cuales 1007 fueron transferibles (28.7%), obteniéndose 523 XX y 484 XY, siendo el SR de los transferibles en D3 SR1t3=0.481. Además, se analizaron 532 embriones biopsiados en D5, obteniéndose 293 XX y 239 XY, siendo el SR de los diagnosticados en D5 SR1d5=0.449, de los cuales 231 fueron transferibles (43.4%), obteniéndose 130 XX y 101 XY, siendo el SR de los transferibles en D5 SR1t5=0.437.

Se obtuvieron diferencias significativas al comparar los SR1 tanto de los diagnosticados SR1d3 y SR1d5, como de los transferibles SR1t5 frente al SR2 de los nacidos tras TRA y DGP (SR2dgp) como de la población general (SR2P), excepto de los transferibles SR1t3 frente a SR2dgp ($P>0.05$). El SR2dgp=0.503, siendo 95 varones y 94 mujeres nacidos. El SR2 de la población general se sitúa en SR2p=0.515. No se obtuvieron diferencias significativas al comparar SR2dgp frente SR2p.

CONCLUSIONES

Según nuestro estudio, se observa una desviación en el SR1 estadísticamente significativa a favor de los embriones XX tanto de los diagnosticados en D3 o D5, como de los transferibles en D3 o en D5 respecto de SR2dgp y SR2p. Sin embargo, el SR2dgp no es distinto del SR2p ($P>0.05$). Eventos como la esperamatogénesis aberrante, la asociación con dismorfias espermáticas, un eventual pronóstico evolutivo diferencial in vitro asociado al sexo, así como patrones alterados de la inactivación del cromosoma X, podrían estar implicados en la etiología de estos hallazgos.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-056: DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS PREDICITVOS DE FORMACIÓN DE BLASTOCISTO Y DE IMPLANTACIÓN A PARTIR DE EMBRIONES CULTIVADOS CON MEDIO ÚNICO G-TL® (VITROLIFE) EN UN INCUBADOR BENCH-TOP TIME-LAPSE GERI® EN CONDICIONES DE HIPOXIA CONTROLADA

V. Antequera Durán, E. Ferrer Robles, P. Muñoz Soriano, C. Catayud Lliso, M. Ruiz Jorro
CREA Medicina de la Reproducción, Valencia

INTRODUCCIÓN

La identificación del embrión con el mayor potencial de implantación de entre todos los embriones de una misma cohorte es un reto que se persigue desde el inicio de las técnicas de reproducción asistida. La tendencia hacia la realización de transferencias de un único embrión (SETs) requiere del desarrollo de nuevas herramientas de selección embrionaria, como la valoración de parámetros morofcinéticos, que junto con las técnicas de selección clásicas, tienen como objetivo identificar el embrión que tiene mayor probabilidad de dar lugar a un niño nacido sano.

OBJETIVO

Determinar los parámetros morfocinéticos relacionados con la formación de blastocisto, de blastocisto de buena calidad y de implantación de embriones humanos cultivados con el medio único G-TL® (Vitrolife) en un incubador Bench-top Time-lapse (GERI®) en condiciones de hipoxia controlada.

MATERIAL Y MÉTODO

De 412 embriones procedentes de 84 ciclos de ICSI con ovocitos propios sin DGP. La edad media de las pacientes fue 36.3 ± 3.7. Se determinaron los parámetros morfocinéticos predictivos de la formación de blastocisto, blastocisto de buena calidad (ASEBIR) y de implantación. Se analizaron los datos procedentes de 209 blastocistos de los cuales se conocía la implantación de 51.

El cultivo de los embriones se realizó en un incubador Bench-Top Time-lapse (GERI®) a 6,4% CO2 y 5% O2 con el medio G-TL® (Vitrolife).

En el análisis morfocinético se estudiaron los parámetros cuantitativos siguientes: tiempo de desaparición de pronúcleos (PNf), de división celular, compactación y formación de blastocisto (t2, t3, t4, t5, t8, tM, tSB y tEB), tiempos correspondientes a los ciclos celulares (CC1 =t2-PNf, CC2 = t4-t2, CC3 = t8-t4) y los relacionados con la sincronía celular (S2 = t4-t3 y S3 = t8-t5). En cuanto a los parámetros cualitativos se analizaron los patrones de división celular anómala. Se anotaron los valores en horas post-microinyección (h.p.i).

La comparación de los grupos estudiados y la determinación de los parámetros predictivos de formación de blastocisto, de blastocisto de buena calidad y de implantación se realizó mediante un modelo de regresión logística, considerando un parámetro significativo cuando el p_valor<0.05.

RESULTADOS

Los parámetros predictivos de la formación de blastocisto fueron t5 (41.6-52.7 h.p.i), t8 (≤50.1 h.p.i), CC3 (≤15.0 h), S2 (≤0.4 h) y tM (87.0-99.3 h.p.i). En relación a los blastocistos de buena calidad, fueron las variables CC1 (≤3.67 h), CC2 (≤12.5 h), CC3 (≤ 18.0 h), S2 (≤ 2.3 h) y división celular anómala (43.0% blastocistos AB) las de mayor poder de predicción.

Los parámetros predictivos de implantación fueron t2 (≤25.9 h.p.i), t8 (55.5-63.4 h.p.i), CC2 (11.1-12.3 h) y CC3 (17.6-27.4 h).

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos, se han determinado ciertos parámetros morfocinéticos predictivos de desarrollo embrionario y de implantación en embriones cultivados con medio único G-TL® en condiciones de hipoxia controlada. Algunos de éstos coinciden con los resultados publicados por otros autores aunque difieren en la población de estudio, condiciones de cultivo y en los puntos de corte. Por ello, es necesario que cada laboratorio tenga en cuenta sus propias condiciones de cultivo para establecer el mejor modelo de predicción.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-057: BLASTOCENTESIS: RESULTADOS PRELIMINARES DEL ESTUDIO DEL BLASTOCELE MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA

Y. Franco Iriarte (1), M. Velasco Álvarez (1), J. Margareto Sánchez (2), E. Rodríguez Ferradas (1), E. Pérez Larrea (1), N. Costa Borges (3)
(1) Instituto Vasco de Fertilidad Donostia, San Sebastián, Gipuzkoa, (2) Tecnalia, (3) Embryotools

INTRODUCCIÓN

Después de la compactación, el embrión comienza a cavitar en un proceso donde las células se diferencian a masa celular interna (MCI) y trofoectodermo (TE). Tras la polarización de las células del TE comienza la acumulación de fluido del blastocele(FB) aumentando en cantidad a medida que progresa la cavitación. Este fluido del blastocele juega un papel crítico en el mantenimiento del proceso celular durante el desarrollo embrionario ya que proporciona un compartimento para la migración celular. Junto al estudio de proteinas se ha encontrado ADN en el FB el cual está todavía en investigación. Los estudios preliminares hasta el momento presentan resultados conflictivos e inconsistentes para determinar si el estudio del ADN en el FB podría utilizarse como una forma no invasiva de estudio genético en el blastocisto. De esta forma podría determinarse su potencial como fuente de ADN embrionario para una valoración genética preimplantacional evitando procedimientos invasivos de biopsia en el embrión.

OBJETIVO

Determinar la presencia de ADN en el fluido del blastocele mediante NGS y comparar el resultado genético con los cariotipos obtenidos en biopsia de trofoectodermo mediante el mismo análisis genético.

MATERIAL Y MÉTODO

Para este estudio utilizamos 41 blastocistos vitrificados que previamente habian sido biopsiados y que tras conocer su resultado genético no podian ser utilizados para uso clínico.

Para ello desvitrificamos los blastocistos y tras esperar mínimo 4 horas a la expansión de los mismos procedimos a la aspiración de 1 ul aproximadamente de fluido del blastocele utilizando para ello una micropipeta de ICSI.

El fluido del blastocele fue introducido en 2 ul de buffer tamponado para su posterior análisis genético mediante NGS comparando los resultados con los que previamente habiamos obtenido tras biopsia de trofoectodermo.

RESULTADOS

El FB de 41 blastocistos fue aspirado y tras secuenciación masiva obtuvimos amplificación de ADN en 34 blastocistos (81%). 3 blastocistos provenientes de biopsia de trofoectodermo tuvieron un resultado caótico, resultado no claro para realizar una comparación entre ambos grupo.

3 blastocistos discreparon en los cromosoma sexuales observando que en todos ellos la calidad embrionaria de los mismos no era excelente razón que podría explicar esta diferencia.

De esta forma la comparativa cromosómica la podemos realizar en 27 embriones en total. 6 blastocistos de los 27 tuvieron un resultado caótico que podría estar justificado por la poca concentración de ADN observada en el fluido del blastocele.

Si observamos la poliploidia de los 21 embriones restantes la concordancia de poliploidia fue del 100%. Al estudiar más profundamente la concordancia cromosómica obtuvimos en 3 casos de 21 blastocistos una concordancia total (14,3%) y un 57,1% de concordancia cromosómica parcial. En un 28,6 % de los casos las muestras del trofoectodermo y del blastocele predijeron un embrión anormal pero el tipo de aneuploidias diagnosticadas fue diferente. SI consideramos cuantas veces el estatus cromosómico del embrión fue concordante en nuestras muestras podemos decir que de los 504 (21 muestras por 24 cromosomas analizados) cromosomas analizados 60 fueron discordantes. De esta forma la concordancia por cromosoma sería del 88% (444/504). En otras palabras el estatus cromosómico fue predecido en el 88% de los casos.

CONCLUSIONES

Este estudio confirma que el ADN genómico del blastocele puede ser perfectamente aislado, amplificado y evaluado. A pesar de que en un 28,6 % de los embriones no hubo concordancia cromosomica la causa puede ser debida a la vitrificación previa. La cuantificación de ADN tras la aspiración del blastocele no fue lo suficientemente elevada para evitar no solo la discordancia sino los fallos de amplifiación.Este motivo ha propiciado que comencemos con modelo de ratón para poder realizar tras cultivo embrionario blastocentesis primero y posteriormente biopsia de TE para optimizar la técnica y ser capaces de analizar en embriones viables y de mejor calidad embrionaria la eficacia de esta técnica como método no invasivo.

BIBLIOGRAFÍA

Tobler et al (2015). Blastocoel fluid from differentiated blastocysts harbors embryonic genomic material capable of a whole-genome deoxyribnucleic acid amplification.

Magli et al (2016) Preimplantation genetic testing: polar bodies,blastomeres, trophectoderm cells, or blastocoelic fluid.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-058: ¿ESTAMOS HACIENDO UNA BUENA INDICACIÓN DE IAC?

M.A. Guembe Echarri, M.J. Iñarra Velasco, L. Crisol Ortiz, M. Lure Berregui, AP. Gurria de la Torre
Unidad de Reproducción Asistida. Hospital Donostia, San Sebastián, Guipuzcoa

INTRODUCCIÓN

Actualmente en nuestra Unidad de Reproducción Asistida ofertamos 4 ciclos de IAC a las parejas infértiles que cumplan unos mínimos. Estos requisitos son la edad < 40 años, permeabilidad tubárica uni o bilateral, REM ≥ 5mill y un IMC ≤ 30. Con este estudio pretendemos analizar estos requisitos y ver si hay otros factores que pudieran limitar el tipo de parejas que entran en IAC o el número de ciclos a realizar, con el fin de optimizar las tasas de éxito de este programa.

OBJETIVO

Revisar los factores que pudieran influir a la hora de indicar la IAC como técnica de elección y el número de ciclos a realizar.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio retrospectivo. Se analizaron 391 ciclos de pacientes que recurrieron a nuestra Unidad de Reproducción para realizar tratamientos de IAC desde Enero del 2016 hasta la actualidad. Estudiamos diferentes variables que pudieran influir en los resultados: Edad, IMC, REM y causa de infertilidad (endometriosis, factor tubárico relativo, SOP, anovulación, baja reserva ovárica y causa desconocida). El análisis estadístico se realizó con el programa spss 21.0.

RESULTADOS

La edad media de las mujeres que consiguen gestación es muy similar a la de aquellas que no se embarazan (34,27 vs 34,31 respectivamente; p>0,05). En cuanto al IMC, no encontramos relación con la consecución o no de embarazo (22,79 vs 22,34 respectivamente; p>0,05), así como tampoco observamos diferencias en los REM de pacientes que consiguen gestación y que no (12,31 mill vs 12,02 mill respectivamente; p>0,05). La tasa de embarazo en nuestro grupo de pacientes es de 17,8%. Analizando los resultados del programa de IAC en función de la causa de infertilidad observamos diferencias en la tasa de embarazo, aunque estas diferencias no alcanzan la significación estadística. La tasa de embarazo en el grupo de pacientes con endometriosis es del 12% (n=25), en pacientes con factor tubárico relativo del 14% (n=57), en el grupo de anovulación del 38,1% (n=21), en pacientes con baja reserva ovárica es del 40% (n=5) y en aquellas con una causa desconocida la tasa de embarazo es del 17,3% (n=283).

CONCLUSIONES

Nuestros datos indican que la edad, el IMC y el REM no influyen en el éxito de los ciclos de IAC. A la vista de estos resultados podemos decir que siempre que se cumplan los requisitos para entrar en el programa de IAC, en pacientes menores de 40 años la IAC sería la técnica de elección con buenas probabilidades de éxito. Por otro lado, parece que en pacientes con endometriosis y factor tubárico las probabilidades de embarazo en IAC son menores. Aunque este descenso no es significativo, sí que podría ser indicativo a la hora de plantear un número de intentos de IAC a realizar a estas parejas. De todas formas habría que aumentar el tamaño muestral del estudio para ver si estas diferencias llegan a ser significativas.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-059: INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON DRV/COBICISTAT EN VARONES VIH+ Y CALIDAD SEMNINAL

P. Navas Bastida (1), A. Clavero Gilabert (1), M.C. Gonzalvo López (1), L. Martinez Granados (1), H. Gutierrez Rodríguez (1), M. Navarrete Carmona (1), M. Canales Gijón (1), A. Moral Fernández (1), M.A. López Zúñiga (2), M.A. López Ruz (3)
(1) Unidad de Reproducción Humana. UGC Laboratorio Clínico y UGC Obstetricia y Ginecología, HU Virgen de las Nieves, Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (IBS), Granada, Spain, (2) Complejo Hospitalario de Jaén. UGC Medicina Interna, Jaén, Spain, (3) Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (IIBG), Granada, Spain.

INTRODUCCIÓN

La triterapia está establecida como el tratamiento antirretroviral que garantiza la supresión mantenida de la replicación del VIH. Sin embargo, el tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) es incapaz de erradicar la infección por el VIH porque éste puede permanecer latente en diversos reservorios celulares, como el compartimento genital masculino, en los que puede eludir tanto la respuesta inmunitaria como la acción de los antirretrovirales. El tracto genital masculino es un reservorio donde no existe un paralelismo absoluto entre la carga viral del compartimento plasmático y la del semen, ya que existe un acusado gradiente negativo de las concentraciones de los fármacos antirretrovirales.

La monoterapia con inhibidores de la proteasa (IP) es una estrategia terapéutica, alternativa al tratamiento antirretroviral convencional con tres antirretrovirales. Su uso está aceptado como tratamiento de mantenimiento en pacientes muy adherentes, con al menos seis meses de supresión viral. La posibilidad de utilizar un solo fármaco para controlar la infección por el VIH, sin perder las ventajas de eficacia y durabilidad asociadas al TARGA, puede tener consecuencias relevantes en el modo de tratar esta infección, dadas las ventajas que esta opción añade en cuanto a limitar el uso de fármacos potencialmentetóxicos,incrementando las opciones terapéuticas disponibles y disminuyendo los costes del tratamiento.

Por otro lado, el efecto del VIH sobre los parámetros seminales ha sido muy debatido, ya que algunos autores encuentran que los parámetros seminales de los pacientes VIH+ bajo TARGA están por debajo de lo establecido, mientras que otros no encuentran diferencias.

OBJETIVO

Comparar la seguridad y efectividad de la monoterapia mediante IP con DRV/cobi frente a VIH en cuanto a carga viral y calidad seminal se refiere.

MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó un estudio prospectivo observacional entre 2016 – 2017. Se compararon muestras de pacientes VIH+ sometidos durante al menos 24 semanas a diferentes tratamientos de monoterapia antirretroviral: DRV/r (n=21; grupo control) y con DRV/cobi (n=20; grupo estudio). Los criterios de inclusión fueron: pacientes mayores de 18 años con adherencia al tratamiento y carga viral plasmática indetectable (<20 copias/mL) durante al menos 6 meses.

Todas las muestras fueron recogidas en la Unidad de Reproducción y analizadas antes de una hora tras la recogida por una única persona para minimizar la variación interindividual y maximizar la precisión del estudio. El análisis seminal se realizó de acuerdo a las recomendaciones de OMS 2010 y la determinación de la carga viral en plasma seminal se analizó por RT-PCR, para cuantificar el ARN del VIH-1, a través de un analizador COBAS (Ampliprep / Taqman ensayo versión 2.0; Roche).

RESULTADOS

Los parámetros seminales estudiados no revelaron diferencias significativas entre ambos tipos de tratamiento antirretroviral. Las medias obtenidas de: volumen del eyaculado, pH, concentración de espermatozoides, número de células redondas, movilidad progresiva y total, formas normales y vitalidad espermática fueron muy similares entre ambos grupos de pacientes.

Los resultados obtenidos mediante la RT-PCR, mostraron que 1/17 pacientes del grupo control tuvo carga viral detectable en semen (4 muestras no pudieron ser analizadas por inhibición de la PCR), mientras que en el grupo de estudio fue de 4/20, sin alcanzar la significación estadística.

CONCLUSIONES

La monoterapia con DRV/cobi es tan segura y eficaz como la monoterapia con DRV/r en relación a la presencia de VIH en semen, además, de no alterar la calidad seminal.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-060: INFLUENCIA DEL ESTADO DE LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE TUBULINA EN EL FLAGELO DEL ESPERMATOZOIDE HUMANO DURANTE LA CAPACITACIÓN Y LA REACCIÓN ACROSÓMICA IN VITRO

N. Huerta Retamal (1), M. Ferrández Rives (1), P. Sáez Espinosa (1), L. Robles Gómez (1), J. Aizpurua (2), M.J. Gómez Torres (1)
(1) Departamento de Biotecnología de la Universidad de Alicante, Alicante, (2) IVF Spain, Alicante

INTRODUCCIÓN

Durante la espermiogénesis, las espermátides redondas haploides sufren un proceso de remodelación a nivel estructural y molecular. Uno de los cambios más importantes afecta al citoesqueleto del espermatozoide con la formación, organización y regulación de los microtúbulos compuestos de dímeros - y -tubulina, estructura importante para una correcta motilidad del espermatozoide. Por otra parte, también es imprescindible una correcta fosforilación de tirosinas, concretamente a nivel del flagelo del espermatozoide, para desarrollar la hipermotilidad característica de la capacitación espermática.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue conocer si el estado de fosforilación de tirosinas influye en la distribución de tubulina a lo largo del flagelo tras la capacitación y la reacción acrosómica.

MATERIAL Y MÉTODO

Las muestras se obtuvieron de donantes normozoospérmicos. La capacitación se llevó a cabo mediante *swim-up* 1h y la inducción de la reacción acrosómica mediante ionóforo de calcio A23187. La valoración del estado de fosforilación de tirosinas y el estudio del citoesqueleto se realizó de manera simultánea por inmunofluorescencia indirecta en células espermáticas. La fosforilación de tirosina se observó usando el anticuerpo anti-fosfotirosina (PY20) y un anticuerpo secundario conjugado con FITC, mientras que para el estudio del citoesqueleto se empleó el anticuerpo anti- -tubulina y un anticuerpo secundario conjugado con Cy3. El estado acrosomal se evaluó mediante la lectina *Pisum sativum agglutinin* (PSA) conjugada con FITC. Se observó un mínimo de 100 células por muestra mediante microscopía confocal y los datos se analizaron mediante la distribución t de Student ($p<0,05$).

RESULTADOS

El porcentaje de espermatozoides PY20+ de la muestra en fresco fue de 5,6% y en la muestra capacitada fue 8,6%, observandose un incremento significativo en la muestra reaccionada (28,93%).

Tras la evaluación del citoesqueleto, detectamos 4 patrones de distribución de tubulina: el patrón 1 (P1) sin marcaje; el patrón 2 (P2) que presenta un intenso marcaje en toda la cola; el patrón 3 (P3) con un marcaje intenso en la porción final del flagelo; y el patrón 4 (P4) que presenta una fluorescencia intensa de manera discontinua a lo largo de todo el flagelo (Figura 1). Tanto antes como después de la capacitación *in vitro*, en aquellos espermatozoides PY20+ el patrón significativamente más abundante fue P2 (54,11% y 47,14% respectivamente) con respecto a los espermatozoides que no presentaron inmunofluorescencia para la -tubulina (P1). Sin embargo, en los espermatozoides PY20-, P4 (61,39% en fresco y 51,94% en capacitados) fue significativamente mayor con respecto a P1 (3,57% y 4,27%) y P2 (8,77% y 4,83%). En los espermatozoides reaccionados, el patrón más abundante de las células con fosforilación en el flagelo siguió siendo P2 (62,23%), presentando diferencias significativas frente al resto de patrones. Mientras que, en los espermatozoides PY20- , P3 (44,02%) y P4 (41,20%) fueron los patrones más representativos, encontrando diferencias significativas con el resto de patrones de distribución.

CONCLUSIONES

- El porcentaje de espermatozoides que presentan fosforilación de tirosinas sufre un aumento progresivo tras la capacitación y la reacción espermática.
- Existe una correlación directa entre el estado de la fosforilación de proteínas y la distribución de tubulina.
- Tras la capacitación y la reacción acrosómica, la mayoría de espermatozoides con presencia de fosforilación de proteínas, presentan una distribución de la α-tubulina homogénea y continua a lo largo del flagelo. Sin embargo, aquellos espermatozoides capacitados y reaccionados, pero sin presencia de fosforilación, la distribución de la tubulina fue mayoritariamente de forma discontinua a lo largo de la cola. Por lo tanto el estudio de estos dos biomarcadores nos permite llevar a cabo una mejor selección de los espermatozoides tras la capacitación.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

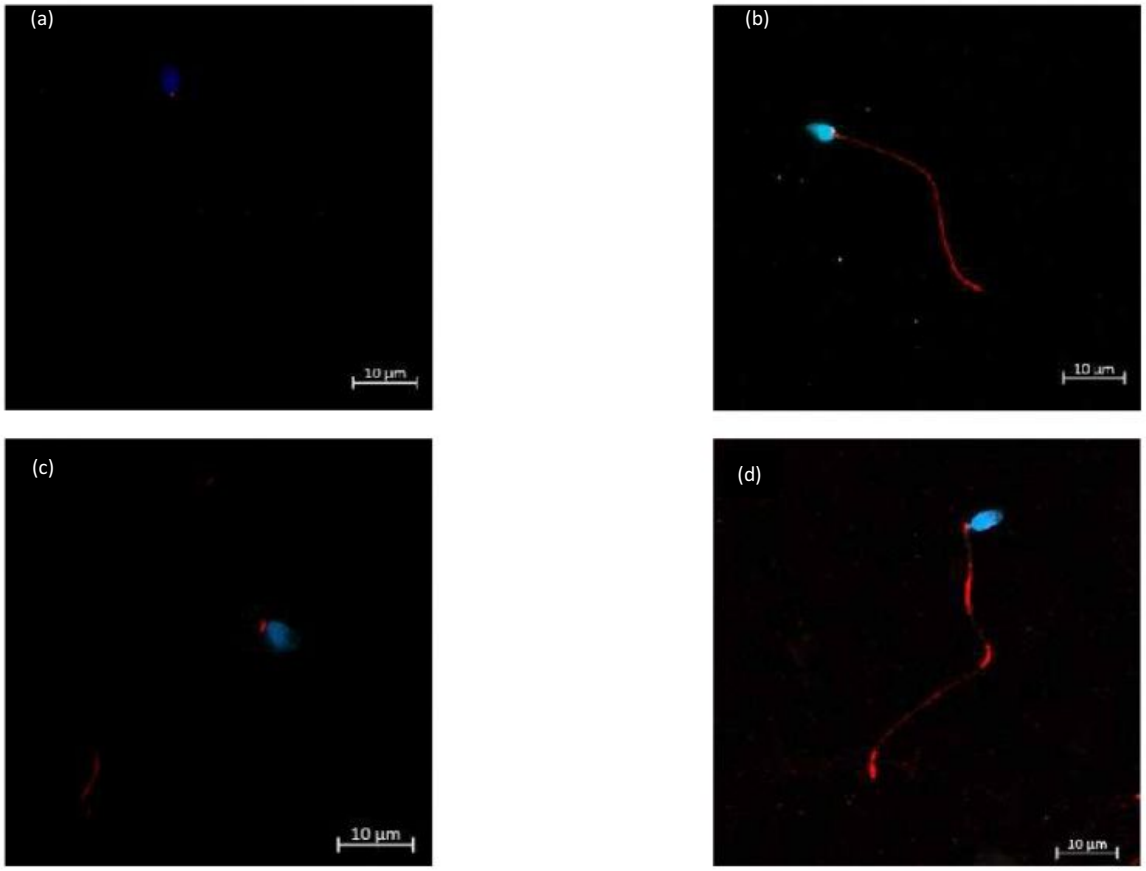


Figura 1: Imnunocalización de **α***-tubulina (rojo) en espermatozoides humanos mediante microscopia confocal de fluorescencia. (a) Sin marcaje, (b) intenso marcaje en toda la cola, (c) marcaje intenso en la porción final del flagelo, (d) fluorescencia intensa de manera discontinua a lo largo de toda la cola. El ADN de los espermatozoides se contrastó con DAPI (azul).*

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-062: EFECTO DEL AFINAMIENTO DE LA ZONA PELÚCIDA MEDIANTE LÁSER (AZPL) EN CRIOTRANSFERENCIAS

B. Amorocho Llanos (1), M. Mollá Silva (1), J. Marcos Alises (1), A. Sánchez León (1), D. Gumbao Baño (1), M. Nicolás Arnao (1), L. Fernández Olmedilla (1), M. Trabalón Pastor (1), J. Landeras Gutiérrez (1), G. Calderón De Oya (2)
(1) IVI Murcia, Murcia, (2) Embryotools, Barcelona

INTRODUCCIÓN

Se cree que el endurecimiento de la zona pelúcida (ZP) durante los procesos de congelación-vitrificación/descongelación-desvitrificación, genera una disminución en los resultados de gestación/implantación debido a la dificultad del pre-embrión para poder eclosionar. El afinamiento de la ZP pre-embrionaria mediante láser (AZPL) en día 3 (D3) de desarrollo pre-embrionario, podría ser útil para el incremento del éxito reproductivo; Sin embargo, hay pocos estudios publicados donde se demuestre el beneficio de la técnica en criotransferencias dependiendo del afinamiento, con resultados controvertidos.

El AZPL se puede aplicar bien sea a la mitad de la ZP pre-embrionaria (50%) o a una cuarta parte (25%) de la misma.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio retrospectivo, fue valorar el efecto del tipo de afinamiento de la ZP mediante láser (AZPL 25%-AZPL 50%) en criotransferencias en D3 en pacientes de diferentes edades (< 38 años, 38-39 años, >39 años) y preparación endometrial (ciclo natural o sustituido) en función de las tasas de gestación, implantación y aborto.

MATERIAL Y MÉTODO

Se estudiaron 418 ciclos procedentes de ciclos de FIV/ICSI de ovocitos propios. Estos ciclos fueron distribuidos en dos grupos iniciales: Grupo A: 200 ciclos en los que se les realizó AZPL 25% y Grupo B: 218 ciclos restantes a los que se les realizó AZPL 50%, y según preparación endometrial. (Tabla 1). La ZP de los pre-embriones a transferir se afinó usando el sistema Octax laser shot y los datos fueron registrados.

RESULTADOS

Se pueden observar en las tablas 1, 2 y 3

25-50% AZPL	< 38 25	< 38 50	38-39 25	38-39 50	>39 25	>39 50
Criotransfers	134	136	38	50	28	32
T. Gestación	38,1	38,2	31,6	24,0	42,9*	18,8*
T. Implantación	30,12	31,7	24,0	21,4	34,3	15,6
T. Aborto	9,8	19,2	25,0	41,6	33,3	16,6

Tabla 1: Pacientes según edad y % AZPL
**p=0.0524*

25-50% AZPL/ preparación endometrial	< 38 25 Natural	< 38 50 Natural	< 38 25 Sustituido	< 38 50 Sustituido
Criotransfers	47	41	87	95
T. Gestación	34,0	34,2	35,0	40,0
T. Implantación	30,3	26,2	31,6	34,3
T. Aborto	18,7	0	5,7*	26,3*

*Tabla 2: Pacientes según edad, % AZPL y preparación endometrial. *p=0.0257*

25%-50% AZPL / preparación endometrial	38-39 25 Natural	38-39 50 Natural	38-39 25 Sustituido	38-39 50 Sustituido	>39 25 Natural	>39 50 Natural	>39 25 Sustituido	>39 50 Sustituido
Criotransfers	8	15	30	35	11	14	17	18
T. Gestación	12,5	33,3	36,7	20,0	45,5*	7,1*	41,2**	22,2**
T. Implantación	10	42,1	27,5	14,0	33,3	10,0	35,0	16,0
T. Aborto	0	20,0	27,2	57,1	20,0	0	42,8	25,0

*Tabla 3: Pacientes según edad, % AZPL y preparación endometrial. *p=0.0561; **p=0.0454*

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CONCLUSIONES

Nuestros datos muestran que no existen diferencias significativas cuando se realiza el AZPL 25% vs 50% en criotransferencias en pacientes menores de 40 años, mientras que, en las pacientes mayores de 39 años, las tasas de gestación con AZPL 25% tienen una tendencia a obtener un beneficio, aunque la tasa de aborto se observa incrementada sin ser significativa.

Respecto a la preparación endometrial, las pacientes menores de 38 años, con AZPL 50% y ciclo sustituido presentan una mayor tasa de aborto clínico frente al grupo de AZPL 25% con el mismo tipo de preparación endometrial.

Según nuestros resultados, se aconsejaría realizar AZPL 25% en criotransferencias de D3 a pacientes mayores de 39 independientemente de la preparación endometrial.

Para futuros estudios, se podría valorar AZPL 25% en D3 y realizar criotransferencia en blastocisto para incrementar los resultados reproductivos.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-063: MORFOCINÉTICA EMBRIONARIA EN PAREJAS CON VARÓN VIH+

P. Navas Bastida, A. Clavero Gilabert, M.C. Gonzalvo López, L. Martínez Granados, M. Navarrete Carmona, M. Canales Gijón, A. Moral Fernández, L. Martínez Navarro, B. Vila Fernández-Santaella, J.A. Castilla Alcalá
Unidad de Reproducción Humana. UGC Laboratorio Clínico y UGC Obstetricia y Ginecología, HU Virgen de las Nieves, Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (IBS), Granada, Spain.

INTRODUCCIÓN

Gracias al aumento de la esperanza y calidad de vida proporcionada por la introducción del tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA), cada vez más parejas con varón es VIH+ (parejas serodiscordantes) desean tener hijos. La calidad seminal de varones VIH+ puede verse negativamente afectada, de tal manera que la tasa de embarazo tras ciclos de FIV/ICSI en parejas con varón VIH+ puede verse disminuida, como resultado de la propia infección o por el propio tratamiento antirretroviral recibido. Una forma indirecta de valorar este posible efecto negativo es mediante la evaluación de los embriones obtenidos en ciclos de FIV/ICSI. La introducción de la morfocinética embrionaria en las técnicas de reproducción asistida, ha supuesto un gran avance ya que permite visualizar el desarrollo del embrión de manera continua, mediante la consecución de fotogramas seriados capturados a un determinado intervalo de tiempo.

OBJETIVO

Analizar la influencia de la infección en varones VIH+ sobre la calidad embrionaria en programas de FIV/ICSI mediante una plataforma de morfocinética.

MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó un estudio retrospectivo observacional (2013-2016). Se compararon las características morfocinéticas de embriones obtenidos de parejas con varón VIH+ con embriones procedentes de parejas con varón VIH-. Los ciclos de varones VIH- analizados fueron el ciclo sucesivo a un VIH+ cuya mujer fuese de características similares a las del ciclo con varón VIH+. Estas parejas con varón VIH- se sometieron a los mismos protocolos de estimulación para FIV/ICSI y tuvieron características clínicas similares (edad, IMC, FSH basal y duración de la infertilidad). Los varones VIH+ se encontraban bajo TARGA. El lavado de semen se realizó mediante gradientes de densidad, se procedió a la congelación de la muestra de semen lavado en todos los pacientes VIH+ quedando a la espera del resultado de la PCR, que resultó negativa para todos los pacientes. Se seleccionaron 15 ciclos de FIV/ICSI en el grupo con varón VIH+, correspondientes a 11 parejas, mientras que en el grupo con varón VIH- se seleccionaron 15 ciclos, correspondientes a 15 parejas. Los embriones fueron cultivados en la plataforma de morfocinética PrimoVision™. Se analizaron las variables morfocinéticas directas e indirectas. Se aplicó el test de la t de Student con corrección de Bonferroni.

RESULTADOS

La edad media, el IMC y la FSH basal de las mujeres fue similar en ambos grupos. La dosis total empleada de FSH en el grupo con varón VIH+ fue significativamente menor (1993±560 vs 2488±620; $p<0,05$). La tasa de ovocitos MII fue 81,8% en el grupo con varón VIH+ y de 86,8% en las parejas con varón VIH-. Sin embargo, la tasa de fecundación fue significativamente menor en el grupo VIH+ (51,8% vs 66,4%; $p<0,05$). Por otro lado, el número de embriones disponibles de buena calidad (embriones tipo A y B, según la clasificación ASEBIR) fue muy similar en ambos grupos (VIH+: 41,4% vs VIH-: 38,9%), así como el número de embriones transferidos (VIH+: 1,86±0,36 vs VIH-: 1,73±0,45). Se obtuvo un menor número de embriones criopreservados en parejas con varón VIH+ (0,4±0,7 vs 2±2,; $p<0,05$).

Se analizaron un total de 71 embriones procedentes de varones VIH- y 49 procedentes de varones VIH+ mediante tecnología time-lapse. El análisis comparativo de las variables morfocinéticas directas e indirectas mostró unos resultados similares entre ambos grupos.

CONCLUSIONES

Tanto las variables morfocinéticas directas como indirectas indican que no existe una peor calidad embrionaria en parejas con varón VIH+.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-064: ¿PUEDE LA RECUPERACIÓN DE LA SINCRONÍA ENDOMETRIO EMBRIÓN RESCATAR LA CAPACIDAD DE IMPLANTACIÓN DE TODOS LOS EMBRIONES?

P. Gámiz Izquierdo, J.M. de los Santos Molina, A. Mifsud Giner, T. Viloria Samochín, M.J. de los Santos Molina
Instituto Valenciano de Infertilidad, Valencia

INTRODUCCIÓN

Recientes evidencias apuntan que la receptividad endometrial de los ciclos sustituidos es mejor que la de los ciclos estimulados. A pesar que las evidencias científicas son de tipo moderado, y por lo tanto no estaría justificada la aplicación indiscriminada de dicha estrategia, existen algunas situaciones clínicas tales como la elevación prematura de la progesterona, la inducción de la ovulación con agonista de la GnRH o fenómenos de desarrollo embrionario lento, en las que la transferencia diferida podría estar justificada.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio es evaluar si la criopreservación embrionaria y posterior transferencia diferida es una estrategia útil para buscar una mejor sincronía endometrio-embrión mejorando el pronóstico reproductivo.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio retrospectivo de 786 transferencias embrionarias en estadio de blastocisto (553 en fresco y 233 diferidas) realizadas en nuestro centro entre los años 2015 y 2016. En las transferencias diferidas tanto los blastocistos que tardaron 5 días como los que tardaron 6 días en expandir, fueron trasferidos en un ciclo de terapia hormonal sustitutiva con 5 días completos de administración de progesterona vaginal.

Los análisis estadísticos se realizaron mediante test de Chi cuadrado para la comparación de variables categóricas y ANOVA para la de las variables continuas, valores p< 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

	Edad	% Gestación	% Gestación en curso	% Tasa de implantación
Tr FRESCO D5	35.0±3.6	59.4	41.7	47,3
Tr DIFERIDO D5	34.4±3.3	64.6	41.5	55,3
Tr FRESCO D6	36.0±3.0	37.3	25.0	26,4
Tr DIFERIDO D6	34.6±3.7	55.4	29.3	38.7
Total fresco	35.1±3.6	56.4	38.9	44,6
Total diferido	34.5±3.4	59.7	37.8	50.0

Tabla I

RESULTADOS

Las tasas de gestación y gestación en curso de las transferencias en fresco con blastocistos de día 5, son mayores y estadísticamente significativas si las comparamos con las realizadas con blastocistos de día 6 (59.4% vs 37.3%, p= 0.0040 y 41.7% vs 25.0%, p= 0.0074 respectivamente). Esto mismo puede observarse en las tasas de implantación en transferencias en fresco (47.3% vs 26.4%, p=0.0032) y en transferencias diferidas (55.3% vs 38.7%, p= 0.0333). Además, en los blastocistos de día 6, la estrategia de diferir la transferencia resultó en mejoras, estadísticamente significativas de las tasas de gestación (37.3% vs 55.4%, p=0.0330) e implantación (26.4 % vs 38.7%, p=0.0101). Ver Tabla I.

Cuando calculamos la tasa de implantación por calidad embrionaria en cada una

de las modalidades de transferencia, observamos que la tasa de implantación de los blastocitos de buena morfología que tardaron 6 días en expandir, fue rescatada tras la programación de una transferencia en diferido (19.6% en T fresco vs 48.7% en T diferido) llegando a niveles comparables con los blastocitos en día 5 (45.5% en T fresco y 48.7% en T diferido).

Blastocistos tipo A y B	n	Tasa de implantación (%)
Tr fresco dia 5	466	45.5
Tr diferido dia 5	158	48.7
Tr fresco dia 6	45	19.6
Tr diferido dia 6	74	44.6
Blastocistos tipo C		
Tr fresco dia 5	152	19.1
Tr diferido dia 5	24	33.3
T fresco dia 6	48	10.4
T diferido dia 6	51	7.8

Tabla II

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

En el caso de blastocitos de día 5 con una calidad subóptima de trofoectodermo (tipo C según clasificación de ASEBIR), la transferencia diferida no arrojó mejores resultado que en fresco (33.3% vs 19.1% respectivamente) no obteniéndose diferencias significativas entre ambos grupos. Lo mismo ocurrió en aquellos blastocitos con trofoectodermo subóptimo pero que necesitaron 6 días para expandir (7.8 % vs 10.4% respectivamente). Ver Tabla II.

CONCLUSIONES

Las estrategias de criopreservación embrionaria para resincronizar endometrio y embrión parecen funcionar en la mayoría de los grupos estudiados, a excepción de aquellos casos más extremos como son las transferencias de blastocistos con trofoectodermos de subóptima calidad, cuya capacidad de implantación no mejora tras su criopreservación y posterior transferencia diferida. Por tanto, el supuesto aumento de la capacidad de implantación de este tipo de blastocistos al sincronizar mejor el endometrio en una transferencia diferida, se podría ver penalizado por el posible efecto deletéreo que puede suponer el proceso de vitrificación en un embrión de subóptima calidad.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-065: COMPETENCIA DE LOS OVOCITOS HUMANOS TRAS MADURACIÓN IN VITRO

R. Ribes Salvador, P. Torres Gómez, I. Peinado Casas, M. De la Orden Rodriguez, E. Gonzálvez Albadalejo, P.J. Fernández Colom, P. Polo Sánchez, A. Monzó Miralles
Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia

INTRODUCCIÓN

La mayoría de ovocitos obtenidos en ciclos de reproducción asistida han alcanzado el estadio de metafase II. No obstante, un 15-20% permanecen inmaduros (Smitz et al., 2004; Shu et al., 2007), sobretodo en pacientes con baja respuesta a la estimulación ovárica, edad avanzada o una cohorte de folículos asincrónicos (Smitz et al., 1999). En estos casos, la maduración in vitro (MIV) permitiría obtener mayor número de embriones.

OBJETIVO

El principal objetivo fue determinar la tasa de MIV de ovocitos humanos madurados con diferentes medios de cultivo, así como evaluar su competencia mediante activación partenogenética (AP) y su desarrollo embrionario (DE) hasta día 5/6. También se estudió la influencia de la presencia de células de la granulosa residuales (CGr) y la posición de la vesícula germinal (VG) en los ovocitos profase I (PI) sobre la MIV.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio de cohortes prospectivo en el que se obtuvieron 472 ovocitos PI, los cuales fueron divididos aleatoriamente en dos grupos diferenciados por la suplementación (G0, n=230) o no (GI, n=242) del medio de MIV con suero sintético sustitutivo (SSS). Se activaron partenogenéticamente 181 ovocitos con ionomicina de Ca2+ y 6-DAMP. Se evaluaron los signos de activación y se observó su DE hasta día 5/6.

RESULTADOS

Tras exponer los ovocitos PI a los dos medios de MIV, la tasa de rotura de vesícula germinal (RVG) fue ligeramente superior en GI (G0=74,3%; GI=77,3%), mientras que la tasa de MIV fue mayor en G0 (MIV24h: G0=54,3% y GI=51%; MIV48h: G0=72,6% y GI=71,5%), no siendo ninguna de las diferencias estadísticamente significativas. La tasa de activación (TA) fue similar en ambos grupos (G0=67,4%; GI=58,1%), aunque mínimamente superior en G0 (p-valor=0,199). En cuanto al posterior DE, tanto el número máximo de células alcanzado en día 3 (G0=8,87±19,291; GI=7,68±18,99) como la tasa de división celular (TDC) (G0=63,2%; GI=52,9%) fue mayor en G0. No obstante, la tasa de compactación (TCo) (G0=4,7%; GI=7,1%) y cavitación (TCa) (G0=2,3%; GI=2,4%) fue superior en GI, aunque las diferencias no fueron significativas. Asimismo, al analizar el efecto de la presencia o ausencia de CGr en el momento de la MIV, independientemente del grupo de estudio, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de RVG, MIV a las 24h y 48h, TA,TDC, TCo y TCa. En cambio, al analizar la posible relación de la posición de la VG en los ovocitos PI con las variables estudiadas, se observó que los ovocitos con la VG en la periferia (VGp), presentaban diferencias estadísticamente significativas en la tasa de RVG (VGc=56,6%; VGp=79,4%), MIV a las 24h (VGc=34,9%; VGp=56,1%), MIV a las 48h (VGc=53%; VGp=75,4%) y TDC (VGc=39,1%; VGp=61,5%), siendo superior a la de los ovocitos con la VG centralizada (VGc) (p-valor=0,000; 0,000; 0,000 y 0,043 respectivamente). Las TA, TCo y TCa no presentaron diferencias significativas en función de la posición de la VG.

CONCLUSIONES

La suplementación del medio de MIV con SSS no afecta a las tasas de RVG, MIV, TA, DE así como a la tasa de llegada a blastocisto. Así mismo, la presencia o ausencia de CGr en el momento de la MIV tampoco influye en las variables estudiadas. Por el contrario, los ovocitos PI con la VG en la periferia ofrecen mejores tasas de RVG, MIV y división que los ovocitos con la VG en el centro. Esta diferencia puede ser debida a que los ovocitos con la VG centralizada se consideran más inmuaduros nuclear y citoplasmáticamente.

BIBLIOGRAFÍA

Shu Y, Gebhardt J, Watt J. (2007) Fertilization, embryo development, and clinical outcome of immature oocytes from stimulated intracytoplasmic sperm injection cycles. Fertil Steril. 87: 1022-7.

Smitz J, Cortvrindt R. (1999) Oocyte in-vitro maturation and follicle culture: current clinical achievements and future directions. Human Reproduction 14 (Suppl 1): 145-161.

Smitz J, Nogueira D, Vanhoutte L. (2004) Oocyte in vitro maturation. Textbook of Assited Reproductive Technology. Editado por Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z, Londen: Martin Dunitz LTD. 2ª Edición. 125-161. Capítulo 10.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-066: LA PROTEÍNA P38 MAPK REGULA LA ACTIVIDAD DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN DEL INHIBIDOR DE CDKS P27 EN LOS EMBRIONES QUE SE BLOQUEAN IN VITRO

S. Cívico Vallejos (1), E. Vidal Sordé (1), Y. Cívico Vallejos (1), M. Guimerà Leal (1), J.M. Calafell Pozo (1), V. Moreno Folch (1), F. Fabregues Gasol (1), S. Peralta Flores (1), S. Brun Lozano (2), N. Agell Jané (2)
(1) HOSPITAL CLINIC, Barcelona, (2) Facultat de Medicina (Universitat de Barcelona), Barcelona

INTRODUCCIÓN

Hasta un 50% de los embriones obtenidos en los programas de FIV detienen su desarrollo en las primeras fases del cultivo in vitro. Algunos estudios apuntan como posibles causas las condiciones de cultivo subóptimas, las posibles anomalías inherentes al embrión generado in vitro o el fallo en la activación del genoma embrionario. Estudios propios de nuestra Unidad han demostrado que los embriones que se bloquean in vitro sobreexpresan la proteína p27, un inhibidor de CDKs implicado, entre muchos otros procesos celulares vitales para la célula, en el control del ciclo celular, y que la expresión de p27 es regulada a nivel transcripcional. El factor de transcripción de p27 identificado, tanto en los embriones bloqueados, como en los embriones evolutivos, es la proteína FOXO3a (datos propios no publicados). Teniendo en cuenta que los embriones evolutivos presentan niveles de proteína y de mRNA para p27 significativamente inferiores a los encontrados en los embriones bloqueados, la localización nuclear de FOXO3a en todos los embriones estudiados, independientemente de su estado evolutivo, hace pensar que la actividad del factor de transcripción no está regulada únicamente por su localización celular y que, alguna de las modificaciones posttraduccionales o interacciones proteicas que activan FOXO, podría darse en los embriones bloqueados y no en los embriones evolutivos.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio fue determinar si la proteína p38 MAPK activa (Pp38), regulada por estrés, modula la actividad de FOXO3a en los embriones cultivados in vitro.

MATERIAL Y MÉTODO

Para identificar la proteína p38 MAPK se emplearon técnicas de inmunocitoquímica y microscopía confocal. 24 embriones bloqueados y 20 embriones evolutivos fueron fijados y doblemente marcados con anticuerpos específicos para Pp38 MAPK y para p27. Posteriormente, los embriones fueron tratados con anticuerpos secundarios conjugados con los fluorocromos Alexa 488 y Alexa 555 respectivamente. El marcaje de Pp38 MAPK y p27 se valoró de forma cualitativa y el análisis de los datos se realizó mediante el test estadístico Ji-Cuadrado.

RESULTADOS

	Pp38+p27+	Pp38-p27-	Pp38+p27-	Pp38-p27+
Embriones Bloqueados	22	2		
Embriones Evolutivos	1	16	3	

Resultados de la expresión de p27 y Pp38 en embriones bloqueados y evolutivos

El resultado de los datos obtenidos concluyó que las diferencias en la expresión de p27 y Pp38 estaban relacionadas con la evolución o bloqueo de los embriones ($p<0.0001$), de manera que la localización de p38 fosforilada en los embriones bloqueados siempre aparecía asociada a la expresión de p27 en el núcleo.

CONCLUSIONES

1. La proteína p38MAPK regula la actividad del factor de transcripción de la proteína p27, FOXO3a.

2. El estrés oxidativo generado en el cultivo de los embriones in vitro podría ser el responsable de la expresión de Pp38 en los embriones que expresan FOXO3a y p27 en los embriones que se bloquean in vitro.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-067: MOSAICISMO EMBRIONARIO: IMPACTO EN LOS RESULTADOS DE LOS CICLOS DE FECUNDACIÓN IN VITRO (FIV) Y FACTORES ASOCIADOS

J.A. Ortiz Salcedo (1), B. Lledó Bosch (1), R. Morales Sabater (1), E.M. García Hernández (1), J. Ten Morro (2), J. Llácer Aparicio (2), R. Bernabeu Pérez (2)
(1) Instituto Bernabeu Biotech, Alicante, (2) Instituto Bernabeu, Alicante.

INTRODUCCIÓN

En los embriones humanos existe una alta incidencia de anomalías cromosómicas que conduce al fracaso de los ciclos de FIV. El mosaicismo cromosómico consiste en una mezcla de distintas líneas celulares con cariotipo diferente en el mismo embrión. La clasificación de embriones mosaico como embriones aneuploides es un tema polémico, ya que la asociación entre el mosaicismo en las células de trofoectodermo y las células de masa interna es desconocida. Además, parece que hay un mecanismo por el cual el mosaicismo podría ser corregido. Por otra parte, los principales factores que pueden aumentar la incidencia del mosaicismo embrionario aún no han sido establecidos.

OBJETIVO

Los dos objetivos principales del proyecto son:

1. Comprobar si los resultados de los ciclos de FIV están afectados por la transferencia de embriones con mosaicismo cromosómico.

2. Establecer los factores paternos, maternos y embrionarios que aumentan la probabilidad de mosaicismo cromosómico en las células del trofoectodermo.

MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó un cribado cromosómico completo (CCS) a embriones de parejas que asistieron a nuestra clínica de fertilidad de Enero de 2013 a Enero de 2017. El análisis mediante array-CGH (aCGH) se realizó utilizando la plataforma de Agilent SurePrint G3 8x60K CGH. Fueron biopsiadas células del trofoectodermo de embriones en estado de blastocisto (D+5 o D+6).

Se analizaron 1923 blastocistos de 704 ciclos de FIV. Se consideró un embrión de mosaico cuando el porcentaje de mosaicismo, fue superior al 25%. Las diferencias entre los parámetros clínicos entre los grupos de estudio se evaluaron mediante la prueba Chi-cuadrado. Por otro lado, la asociación entre los factores paternos-maternos y el mosaicismo se analizó mediante regresión logística binaria y chi-cuadrado (SPSSv20.0).

RESULTADOS

Se compararon los resultados clínicos entre ciclos en los que se transfirieron exclusivamente embriones con mosaicismo embrionario y ciclos en los que se transfirieron embriones euploides. Aunque los resultados (tasa de implantación, aborto bioquímico y clínico) del primer grupo de estudio fueron inferiores, estas diferencias no alcanzaron significación estadística. Sin embargo, la tasa de embarazo clínico sí que fue significativamente inferior: 20,6% en el grupo mosaico vs 38,9% en el grupo euploide ($p = 0,042$).

En el análisis de factores asociados con el mosaicismo embrionario no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la edad materna de embriones con mosaicismo embrionario vs embriones no mosaico (32,56 vs 32,77; $p = 0,679$). Sorprendentemente la edad del varón fue mayor en el grupo de embriones mosaico (40,83 años) que en los embriones no mosaico (39,93 años); ($p = 0,037$). De hecho, el porcentaje de embriones mosaico para hombres de 40 años o más fue de 14% y 10,7% cuando la edad masculina es menor de 40 años ($p = 0,030$).

El factor masculino no está relacionado con el mosaicismo. Ni la calidad seminal, ni las aneuploidías espermáticas ni la fragmentación del ADN espermático se asociaron con el mosaicismo embrionario ($p = 0,667$, $p = 0,176$ y $p = 0,292$).

Por último, la calidad embrionaria en D+5 sí que se relacionó con el porcentaje de embriones mosaico. Dentro del grupo de embriones de calidad A (Criterios de Asebir) el porcentaje de embriones mosaico (8.2%) es menor que en los embriones de calidad B (13.8%), calidad C (24.1%) y calidad D (22.4%) ($p = 0.000001$).

CONCLUSIONES

Nuestros datos muestran que la transferencia de embriones mosaico afecta los resultados de los ciclos de FIV. A pesar de ello, los embriones mosaico dan lugar a unas tasas de éxito relativamente buenas y por lo tanto no deberían descartarse en parejas que carecen de embriones euploides. Por otro lado, la edad paterna y la calidad embrionaria están asociados con el mosaicismo embrionario.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-070: EFECTO DE LAS VARIABLES CLÍNICAS Y EMBRIONARIAS EVALUADAS EN DÍA 2 Y 3 DE DESARROLLO EMBRIONARIO EN LA OBTENCIÓN DE BLASTOCISTOS

A. Gascón Sánchez (1), A. Palomar Rios (1), J.V. Martínez Sanchis (1), M.J. Soriano Ortega (1), S. Balasch Parisi (2), I. Molina Botella (1)
(1) Unidad de Reproducción Asistida, Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, Valencia, España, (2) Departamento de Estadística e Investigación Operativa Aplicadas y Calidad, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España

INTRODUCCIÓN

Los embarazos múltiples conllevan un riesgo significativo para la salud materno-fetal. Estos riesgos pueden reducirse reduciendo el número de embriones transferidos. Tradicionalmente, la evaluación de la calidad de los embriónes se basa en criterios morfológicos, sin embargo, es un método de clasificación que presenta un gran inconveniente, su alta subjetividad. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevas técnicas de selección embrionaria basadas en el uso de parámetros objetivos que nos permitan seleccionar aquellos embriones con mayor potencial de implantación. En trabajos previos, se demostró que las variables embrionarias morfométricas pueden predecir la implantación embrionaria de manera objetiva, eliminando los principales problemas que presenta la valoración embrionaria mediante criterios morfológicos.

OBJETIVO

El objetivo de nuestro trabajo es evaluar el efecto que ejercen las variables clínicas de la mujer, así como el efecto predictivo de las variables morfológicas y morfométricas embrionarias medidas en día 2 y 3 de desarrollo sobre la obtención de blastocistos tras 5 días de cultivo in vitro.

MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó un estudio retrospectivo en el que se estudiaron las variables clínicas de la mujer y las variables embrionarias tanto morfológicas como morfométricas de 306 embriones en día 2 y en día 3 del cultivo in vitro. Las variables morfométricas se obtuvieron analizando las fotografías de los embriones mediante el programa ImageJ. Las variables morfométricas embrionarias que fueron estudiadas estaban relacionadas con la forma del embrión (factor de circularidad), tamaño (perímetro interno) y apariencia de la zona pelúcida (grosor). En cuanto a las variables morfológicas, se observó el grado de fragmentación, el número de células embrionarias y la simetría entre células (clasificación ASEBIR). Para el análisis estadístico, se realizó un modelo de regresión logística binaria para estudiar el efecto de las variables clínicas y embrionarias en la obtención del blastocisto.

RESULTADOS

Los resultados del modelo de regresión logística se expresan como coeficiente de regresión (RC), estimado Odd Ratio (OR) y p-valor (P). La edad de la mujer es una variable clínica que influye de manera significativa en el desarrollo a estadio de blastocisto (RC: -0.096; OR: 0.908; P = 0.009). En cuanto a las variables morfológicas y morfométricas evaluadas en el día 2 de desarrollo embrionario no han resultado ser estadísticamente significativas para la predicción de blastocisto. Sin embargo, para día 3 de desarrollo, la variable morfológica número de células (RC: 0.199, OR: 1.221, P = 0.032), clasificación ASEBIR (RC: 1.359, OR: 3.895, P = 0.027) y la variable morfométrica perímetro interno (RC: -0.006 OR: 1.006; P = 0,050) si han resultado ser estadísticamente significativas en la predicción de llegada a estadio de blastocisto.

CONCLUSIONES

En cuanto a las variables clínicas de la mujer, se ha observado que el aumento en la edad de las mujeres es una variable clínica que influye negativamente en el desarrollo de los embriones hasta el estadio de blastocisto. Las variables morfológicas y morfométricas evaluadas en el día 2 desarrollo embrionario no permiten la predicción de llegada a blastocisto en los embriones evaluados. Sin embargo, la variable morfológica número de células, clasificación ASEBIR y la variable morfométrica perímetro interno evaluadas en día 3 de desarrollo si permiten predecir la llegada a blastocisto.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-071: ASOCIACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE OVOCITOS METAFASE II RECUPERADOS Y LA TASA DE RECIÉN NACIDO VIVO EN UN CICLO DE ICSI

C. Álvarez Lleó, M. Sánchez Toledo, C. García Garrido, M. Resta Serra, G. González de Merlo
Hospital General Universitario de Albacete

INTRODUCCIÓN

El éxito de los tratamientos de ICSI se logra con el nacimiento de un niño sano. Lo deseable es conseguir con menor coste y riesgo de hiperestimulación ovárica, un número de ovocitos maduros suficiente para lograr un embarazo único.

OBJETIVO

Evaluar la asociación entre el número de ovocitos metafase II (MII) por ciclo de ICSI en fresco y la probabilidad de recién nacido vivo (RNV).

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio retrospectivo. Se evaluó la tasa de RNV de 858 ciclos de ICSI (686 pacientes) con transferencia embrionaria en fresco, desde enero del 2011 a diciembre del 2015. La edad media fue 34,8±3,7 (20-44 años) La estimulación ovárica se llevó a cabo con ant-GnRH y dosis variables de FSH/LH. Se obtuvieron 6498 ovocitos que fueron decumulados transcurridas 1-2 horas desde su recuperación, siendo 5186 MII (79,8%) Se realizaron 3 grupos según el número de ovocitos MII recuperados: grupo I $\leq$ 5 (n=445), grupo II entre 6-10 (n=314) y grupo III > 10 (n=99) La fecundación se valoró 16-19 horas post-ICSI. Se clasificaron los embriones en categorías según su calidad (ASEBIR), realizando la transferencia embrionaria en D+2/D+3 tras la microinyección.

Se comparó entre los tres grupos: la edad, causa de esterilidad, dosis de gonadotropinas y días de estimulación; niveles de E2 basal y grosor de la línea endometrial (LE) el día de la hCG; número total de ovocitos recuperados y fecundados; número y calidad de los embriones transferidos; y tasas de beta-hCG positiva, embarazo clínico, embarazo múltiple, implantación, abortos y RNV. Las diferencias se consideraron significativas para p<0,05.

RESULTADOS

No hubo diferencias significativas en el número de días de estimulación, dosis de gonadotropinas administradas y grosor de la LE. Se encontraron diferencias estadísticas en la causa de esterilidad entre los 3 grupos, la causa de esterilidad femenina fue mayor en el grupo I (44 % vs. 27,1% y 22,2%), y la masculina (9,9% vs. 26,8% y 31,3%) y de origen desconocido (EOD) (7,2% vs. 13,1% y 13,1%) en los grupos II y III, no encontrándose diferencias cuando se trataba de endometriosis o causa mixta. Se observaron diferencias significativas en la edad de las pacientes (35,3±3,6 vs. 34,4±3,7 y 34,2±3,5), siendo mayor en el grupo I. El número de embriones transferidos fue mayor en los grupos con mayor número de MII (grupo I: 1,7±0,5 vs. grupo II: 1,9±0,4 y grupo III: 1,9±0,4) transfiriéndose un número medio de embriones tipo A superior en el grupo con más de 10 ovocitos maduros (grupo I: 0,2±0,4; grupo II: 0,2±0,4 y grupo III: 0,4±0,60) Por otra parte, el nivel de E2 (grupo I: 1118,3±879,1; grupo II: 1711,3±1016,4; grupo III: 2102,8±939,9), número de ovocitos recuperados (grupo I: 4,7±2,3; grupo II: 9,3±2,3; grupo III: 15,3±3,3) y número de ovocitos fecundados (grupo I: 2,5±1,2; grupo II: 4,9±1,9; grupo III: 8,0±3,1), fue significativamente diferente entre los 3 grupos, incrementándose en los grupos con mayor número de ovocitos maduros.

Las tasas de gestación (grupo I: 33%; grupo II: 41,1% y grupo III: 49,5%), gestación múltiple (grupo I: 12,9%; grupo II: 26,4% y grupo III: 33,6%), implantación (grupo I: 21,5%; grupo II: 25,9% y grupo III: 33,9%), y RNV (grupo I: 27,9%; grupo II: 35,9% y grupo III: 38,4%) fueron estadísticamente superiores en los grupos II y III; mientras que no hubo diferencia en cuanto a la tasa de abortos.

CONCLUSIONES

- La tasa de RNV se incrementa cuando el número de ovocitos maduros recuperados es superior a 6.
- El grupo de pacientes con mayor número de ovocitos maduros presentó un mayor número de embriones óptimos dada la menor edad media y el mejor pronóstico reproductivo de este grupo.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-072: DESARROLLO DE UN SISTEMA DE MONOCAPA DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA PARA EL CULTIVO DE OVOCITOS PROFASE I EN MADURACIÓN IN VITRO

P. Torres Gómez (1), B. Brzezinska (1), I. Peinado Casas (1), R. Ribes Salvador (2), M. de la Orden Rodríguez (1), P. Polo Sánchez (1), M J. Gómez Torres (3)
(1) H. Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, (2) Clínica Irema, Beniarbeig, Alicante, (3) Departamento Biotecnología, Universidad Alicante, Alicante

INTRODUCCIÓN

Sólo la tercera parte de los ovocitos inmaduros, tras maduración in vitro (MIV), alcanzan la competencia madurativa y poseen la capacidad de producir blastocitos viables para su transferencia. Los resultados sugieren que algunos aspectos de la maduración citoplasmática o nuclear no son adecuados en ovocitos procedentes de MIV, lo que indica que la técnica todavía está en fase experimental y necesita mejorar antes de introducirse en los tratamientos rutinarios de Reproducción Asistida (RA).

El ambiente folicular apoya la maduración ovocitaria gracias a las células de la granulosa (CG) que rodean el ovocito y que se comunican con él a través de uniones tipo gap junction y de factores paracrinos, permitiendo transferir al ovocito nutrientes y otros metabolitos que facilitan la reanudación de la meiosis. Además, las CG cumplen también un papel protector al controlar la concentración de oxígeno. Por todo ello, es importante contar con las CG para diseñar nuevos sistemas de MIV.

OBJETIVO

Los objetivos de este estudio fueron: (a) establecer las condiciones adecuadas para crear un sistema de cultivo en monocapa con CG para MIV y (b) determinar la tasa de maduración de ovocitos PI humanos co-cultivados sobre la monocapa.

MATERIAL Y MÉTODO

Tanto la granulosa como los ovocitos inmaduros PI, se obtuvieron de pacientes sometidas a tratamiento convencional de RA. Los ovocitos recuperados se decumularon y las CG extraídas se centrifugaron y resuspendieron en medio nutritivo. Se realizó recuento y viabilidad celular, y se cultivaron en tres medios diferentes: grupo A (GA) con G1 (Vitrolife®), grupo B (GB) con CCM(Vitrolife®) y el grupo C (GC) con T199 (Sigma®) suplementado con suero sintético 10% (Irvine®) y hMG. Todas las muestras se cultivaron a 370C y 6% de CO2. Se valoró el crecimiento celular y la formación de la monocapa mediante imágenes capturadas, a las 0h, 24h, 48h, 96h, 120h y 144h, con un programa de análisis de imagen instalado en un microscopio invertido. También se identificaron y contabilizaron otros tipos celulares como células sanguíneas y células epiteliales.

RESULTADOS

Se obtuvieron 18 monocapas de las 52 muestras estudiadas (34,6%). Existiendo diferencias significativas (0.009) en la formación de la monocapa dependiendo del medio utilizado: GA: 19.2%, GB: 17,3%, GC: 63,6%. La formación de la monocapa se veía favorecida con viabilidades mayores del 80% (0.014). Sin embargo, el número de células sanguíneas tuvo un impacto inversamente proporcional, afectando al crecimiento y la forma (agregados) de las CG. Tras MIV de 8 ovocitos PI en co-cultivo bidimensional de CG, se obtuvo una tasa de maduración del 50% en 24h y del 75% en 48h, siendo la tasa de rotura de la vesícula germinal (RVG) de 88%.

CONCLUSIONES

De los tres medio evaluados en este estudio el TCM199 suplementado con suero sintético y hMG fue el más adecuado para la formación de la monocapa de CG. La suplementación y/o los propios componentes de este medio tienen una influencia positiva sobre el crecimiento de CG.

La importancia para el cultivo con CG no reside tanto en la cantidad de células sino en su viabilidad el día 0 de cultivo, siendo además beneficioso un escaso o nulo número de células sanguíneas.

La MIV ovocitaria en monocapa de CG consigue buenas tasas de maduración, aunque hay que puntualizar que solo se valoró la maduración nuclear (presencia del primer corpúsculo polar).

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-073: CARACTERIZACIÓN DE LA OLA CITOPLASMÁTICA PREVIA A LA APARICIÓN DE PRONÚCLEOS; UN EVENTO IMPRESCINDIBLE PARA LA FECUNDACIÓN Y CORRECTO DESARROLLO EMBRIONARIO

M. Ruiz Jorro (1), V. Antequera (1), E. Ferrer (1), P. Muñoz (1), M. Ferrer (2), X. Vendrell (3), C. Calatayud (1)
(1) CREA - Medicina de la Reproducción, Valencia, (2) Hospital Universitario de Gante - Bélgica, (3) Sistemas Genómicos - Paterna, Valencia

INTRODUCCIÓN

La valoración del éxito de la fecundación se ha descrito a través de cambios morfológicos o eventos tempranos tales como la extrusión del segundo corpúsculo polar y la aparición de pronúcleos. Sin embargo, numerosos estudios han descrito la presencia de diferentes fenómenos, en particular movimientos citoplasmáticos (Ajduk y Zernicka-Goetz 2011, 2014) previos a la aparición de los pronúcleos. La primera publicación en humanos (Payne 1997) describe la presencia de una serie de ondas circulares, posiblemente relacionadas con las ondas de Calcio que inicia la activación ovocitaria, en un grupo reducido de 50 ovocitos analizados mediante un sistema Time-Lapse (TL) experimental. Posteriormente, Mio y colaboradores (2014) describen de nuevo el fenómeno en 286 ovocitos humanos, también con un sistema TL experimental. La presencia de movimientos citoplasmáticos se ha relacionado con la posterior calidad y potencial reproductivo del embrión. La comercialización y uso generalizado de incubadores con sistema TL, dio lugar a la descripción de eventos relacionados con calidad embrionaria. Sin embargo, la Ola Citoplasmática no ha sido incluida como indicador, posiblemente por la baja frecuencia de toma de imágenes de estos primeros incubadores TL. La reciente aparición de nuevos incubadores Bench-Top Time-Lapse (BT-TL), con una mayor frecuencia de captura de imágenes, permite la visualización de esta ola citoplasmática previa a la aparición de pronúcleos. Determinar sus características y la posibilidad de ser medida de forma fiable, es fundamental como paso previo a la posible validación de este evento como indicador de calidad embrionaria.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue medir las características de la Ola Citoplasmática previa a la aparición de pronúcleos (PN) en ovocitos humanos inseminados mediante ICSI.

MATERIAL Y MÉTODO

Se analizó la Ola Citoplasmática (OC) y el posterior desarrollo embrionario hasta blastocisto mediante un incubador BT-TL (GERI – Genea) en 500 ovocitos humanos inseminados mediante ICSI. Tras la microinyección, los ovocitos fueron incubados en medio único (G-TL – Vitrolife) en hipoxia (5% O2). Los primeros 40 ovocitos fueron valorados de forma independiente por dos embriólogas. Una vez se comprobó la coincidencia de las medidas realizadas - fundamentalmente presencia o ausencia de ola, dirección, momento de aparición y duración de la misma - el resto de los ovocitos fue valorado por una embrióloga.

RESULTADOS

La OC se observa como un barrido que se inicia en la zona del ovocito donde aparecerá el pronúcleo masculino y barre el citoplasma hasta el extremo opuesto de la célula. Se inicia entre 3 y 8 horas tras la microinyección (media 5,3 h) y tiene una duración media de 1,1 horas con un rango de 0,5 – 1,6 horas. Tras el barrido, aparece el pronúcleo masculino. Posteriormente, aparece el femenino próximo al segundo corpúsculo polar y ambos PN se aproximan. En el lado donde finaliza la ola, se observa la aparición de una zona más clara y menos granulada (halo), posiblemente por la ya descrita migración de las diferentes estructuras citoplasmáticas hacia la zona donde se encuentran los pronúcleos. En los ovocitos en los que no se observó OC, no hubo aparición de pronúcleos. Este patrón se repite en todos los ovocitos microinyectados, si bien en algunos, dependiendo de la posición en que se encuentre, puede ser más dificultosa su observación.

CONCLUSIONES

En los ovocitos analizados, tras la microinyección espermática y antes de la aparición de pronúcleos se observa una única Ola Citoplasmática que barre el ovocito con un patrón muy determinado y es aparentemente imprescindible para la fecundación y posterior desarrollo embrionario.

La validación de este evento como posible indicador de calidad embrionaria, requiere el estudio de su fundamento biológico, la confirmación de la capacidad diagnóstica de la tecnología utilizada y la valoración de su posible capacidad predictiva con estudios clínicos prospectivos.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-074: ANÁLISIS RETROSPECTIVO DE LOS RESULTADOS DE ESTUDIOS PREIMPLANTACIONALES SOBRE PAREJAS PORTADORAS DE TRANSLOCACIONES EQUILIBRADAS

S. González-Reig, V. Penacho, D. Amorós, H. Blanca, N. Castejón-Fernández, A. López-Huedo, F. Galán, M.A. Fernández, L.A. Alcaraz
Bioarray SL, Elche, Alicante

INTRODUCCIÓN

La presencia de translocaciones equilibradas se produce aproximadamente en el 9% de las parejas que sufren abortos de repetición. En publicaciones anteriores se cuantificaba el riesgo para estas parejas de generar un embrión portador de aneuploidias o alteraciones en desequilibrio en un 75% para los portadores de translocaciones equilibradas, mientras que aquellas parejas con un portador de translocaciones robertsonianas el riesgo se reducía a un 45%. Dichas cifras se obtuvieron combinando datos de FISH y array-CGH. Sin embargo, el número de trabajos sobre esta temática es especialmente limitado.

OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es el de actualizar, mediante el uso técnicas de Next-Generation Sequencing (NGS) aplicadas al estudio preimplantacional de aneuploidias en embriones (PGS), las cifras de riesgo de obtener determinados embriones con alteraciones desequilibradas para aquellas parejas portadoras de translocaciones equilibradas y/o robertsonianas. Para ello se ha realizado un estudio retrospectivo de los pacientes portadores de dichas alteraciones sometidos a un ciclo de PGS dentro del conjunto de técnicas de reproducción durante los años 2015-2016. Dicha información puede ser valiosa a la hora de aconsejar a las parejas portadoras de dichas alteraciones.

MATERIAL Y MÉTODO

Para el estudio se ha requerido la participación de un total de 35 parejas sometidas a un ciclo de reproducción en las que, al menos, uno de los miembros era portador. En total, 192 embriones han sido analizados.

Para el análisis de PGS se ha utilizado la plataforma de secuenciación masiva IonTorrent (Thermo-Fisher) y el kit Reproseq (Thermo-Fisher). El análisis informático de los datos de PGS se ha realizado mediante el software IonReporter (Thermo-Fisher) y herramientas bioinformáticas propias.

RESULTADOS

Las parejas analizadas eran portadoras de 25 translocaciones reciprocas diferentes y 10 robertsonianas. Las translocaciones reciprocas se dividieron en grupos: aquellas con puntos de rotura en una zona terminal (grupo 1, n=13) o en una interna del cromosoma (grupo 2, n=6). Otros grupos están formados por aquellas alteraciones en cromosomas acrocéntricos (grupo 3, n=6), y por alteraciones robertsonianas (grupo 4, n=10).

Según la división anterior, aquellos pacientes dispuestos en los grupo 1 y 3 obtuvieron un porcentaje significativamente mayor de embriones con segregaciones no equilibradas (adyacentes I y II, 3:1 o 4:0) que alternantes (64.1% vs 35.9%). En aquellos pacientes del grupo 2, las segregaciones alternantes son más frecuentes (57,7% vs 42.3%). Entre los pacientes del grupo 4, las segregaciones alternantes son mucho más numerosas (76% vs 24%). En todos los grupos se establece la aparición de embriones con alteraciones no relacionadas y se seleccionaron como transferibles el 17,6% (grupos 1 a 3) y el 38% (grupo 4).

CONCLUSIONES

La presencia de alteraciones equilibradas en la población se ha establecido como una causa frecuente de infertilidad. Frente a ello es posible realizar PGS sobre los embriones para descartar aquellos portadores de aneuploidias o alteraciones desequilibradas y permitir la transferencia de embriones viables. El uso de técnicas de NGS se está imponiendo por su rapidez y eficacia.

En el presente trabajo mostramos como aquellas parejas portadoras de alteraciones equilibradas con puntos de roturas terminales o en cromosomas acrocéntricos presentan un riesgo aumentado de generar embriones portadores de alteraciones relacionadas, frente a los portadores de alteraciones con puntos de rotura no-terminales o con alteraciones robertsonianas. El hecho de que el portador de la alteración sea el paciente masculino o femenino parece influir ligeramente en el resultado.

Así, es posible establecer un pronóstico de la pareja en función a las variables estudiadas: p.e. parejas en las que la mujer es portadora de una alteración en cromosoma acrocéntrico, o en una zona terminal tendrán un pronóstico más nocivo que aquellas en los que el afectado es un varón con una alteración robertsoniana.

BIBLIOGRAFÍA

Alfarawati, S., Fragouli, E., Colls, P., Wells, D., 2011. First births after preimplantation genetic diagnosis of structural chromosome abnormalities using comparative genomic hybridization and microarray analysis. Hum. Reprod. 26, 1560-1574.

Anton, E., Vidal, F., Blanco, J., 2008. Reciprocal translocations: tracing their meiotic behavior. Genet. Med. 10, 730-738.

Colls, P., Escudero, T., Fischer, J., Lekleniak, N.A., Ben-Ozer, S., Meyer, B., Damien, M., Grifo, J.A., Hershlaq, A., Munne, S., 2012. Validation of array comparative genome hybridization for diagnosis of translocations in preimplantation human embryos. Reprod. Biomed. Online. 24, 621-629.

Fiorentino, F., Spizzichino, L., Bono, S., Biricik, A., Kokkali, G., Rienzi, L., Ubaldi, F.M., Iammarrone, E., Gordon, A.,Pantos, K., 2011. PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. Hum. Reprod. 26, 1925-1935.

Fiorentino, F., Bono, S., Biricik, A., Nuccitelli, A-. Cotroneo, E., Cottone, G., Kokocinski, F., Michel, C.E., Minasi, M.G., Greco, E., 2014. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. Hum. Reprod. 29, 2802-2813.

Idowu, D., Merrion, K., Wemmer, N., Mash, J.G., Pettersen, B., Kijacic, D., Lathi, R.B., 2015. Pregnancy outcomes following 24-chromosome preimplantation genetic diagnosis in couples with balanced reciprocal or Robertsonian translocations. Fertil. Steril. 103, 1037-1042.

Lledo, B., Ortiz, J.A., Morales, R., ten, J., de la Fuente, P.E., Garcia-Ochoa, C., Bernabeu, R., 2010. The paternal effect of chromosome translocation carriers observed from meiotic segregation in embryos. Hum. Reprod. 25, 1843-1848.

Munne, S., 2005. Analysis of chromosome segregation during preimplantation genetic diagnosis in both male and female translocation heterozygotes. Cytogenet. Genome. Res. 111, 305-309.

Ko, D.S., Cho, J.W., Park, S.Y., Kim, J.Y., Koong, M.K., Song, I.O., Kang, I.S., Lim, C.K., 2010. Clinical outcomes of preimplantation genetic diagnosis (PGD) and analysis of meiotic segregation modes in reciprocal translocation carriers. Am. J. Med. Genet. A. 152A, 1428-1433.

Shaffer, L.G., Slovak, M.L., Campbell, L.J., 2009. Karger, S. (Ed.),. An international system for human cytogenetic nomenclature (2009). New York.

Tan, Y.Q., Tan, K., Zhang, S.P., Gong, F., Cheng, D.H., Xiong, B., Lu, C.F., tang, X.C., Luo, K.L., Lin, G., Lu, G.X., 2013. Single-nucleotide polymorphism microarray-based preimplantation genetic diagnosis is likely to improve the clinical outcome for translocation carriers. Hum. Reprod. 28, 2581-2592.

Tobler, K.J., Brezina, P.R., Benner, A.T., Du, L., Xu, X., Kearns, W.G., 2014. Two different microarray technologies for preimplantation genetic diagnosis and screening, due to reciprocal translocation imbalances, demonstrate equivalent euploidy and clinical pregnancy rates. J. Assist. Reprod. Genet. 31, 843-850.

Ye, Y., Quian, Y., Xu, Ch., Jin, F., 2012. Meiotic segregation analysis of embryos from reciprocal translocation carriers in PGD cycles. Reprod. Biomed. Online. 24, 83-90.

Zhang, Y., Zhu, S., Wu, J., Liu, S., Sun, X., 2014. Quadivalent asymmetry in reciprocal translocation carriers predicts meiotic segregation patterns in cleavage stage embryos. Reprod. Biomed. Online. 29, 490-498.

Table 1. Alterations Analyzed
Group 1: Reciprocal translocations with terminal breakpoints

1.- 46,XX,t(1;2) (q32;p25)

2.- 46,XY,t(1;5) (p12;p15.3)

3.- 46,XY,t(1;5) (q44;q12)

4.- 46,XX,t(2;3) (p25.1;p13)

5.- 46,XX,t(2;7) (p25.1;p15.1)

6.- 46,XY,t(2;11) (q21.1;p15.5)

7.- 46,XY,t(3;4) (p23;q33)

8.- 46,XY,t(3;4) (q26.3;q34)

9.- 46,XX,t(3;7) (q27.3;M p21.3)

10.- 46,XX,t(3;9) (p21.1;q34.1)

11.- 46,XX,t(3;11) (q25;q24)

12.- 46,XY,t(8;10) (q24;q24)

13.- 46,XY,t(12;179 (q24.3;q25)

Group 2: Reciprocal translocations without terminal breakpoints

1.- 46,XX,t(1;4) (q24;q31)

2.- 46,XY,t(1;5) (p13;p13)

3.- 46,XY,t(2;18) (q23;q12.1)

4.- 46,XY,t(3;17) (p23;q23.1)

5.- 46,XY,t(4;9) (p15.3;q31.2)

6.- 46,XY,t(4;11) (q28;q22)

Group 3: Reciprocal translocations with acrocentric chromosomes

1.- 46,XX,t(2;13) (p25.1;q22)

2.- 46,XY,t(4;14) (p16;q31)

3.- 46,XX,t(9;22) (q34;q13.31)

4.- 46,XY,t(6;22) (q22.2;q21.1)

5.- 46,XY,t(11;22) (q23;q11)

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-075: RESCATE DE CICLOS DE DGP CON ESTUDIO DE EMBRIONES EN D3 MEDIANTE EL REANÁLISIS EN D5/D6

O. Martinez Pasarell (1), O. López Rodrigo (1), E. Toro Toro (2), C. Giménez Sevilla (2), A. Polo Ramos (3), A. Mata Vila (1), A. Garcia Jiménez (1), L. Bassas Arnau (1)
(1) FUNDACIO PUIGVERT, Barcelona, (2) Reprogenetics Spain, Barcelona, (3) Fundacio Puigvert-Hospital de Sant Pau, Barcelona

INTRODUCCIÓN

El estudio genético de una sola célula presenta un riesgo aproximado del 8% de ausencia de resultado por fallos de amplificación, ADO o contaminación, entre otros posibles problemas metodológicos. Presentamos dos casos de DGP por enfermedad monogénica con selección de embriones HLA compatibles con terceras personas (DGP-SG-HLA) y un caso de DGP por enfermedad monogénica (DGP-SG), cuyo resultado inicial resultó en ausencia de embriones aptos para transferencia por la ausencia de resultados concluyentes en uno o más embriones. En los tres casos se realizó nueva biopsia en estadio de blastocisto (D5/D6) para el rescate de los ciclos.

OBJETIVO

Obtener resultados diagnósticos en ciclos de DGP fallidos en D3 a causa de problemas metodológicos asociados al estudio genético de una sola célula embrionaria.

MATERIAL Y MÉTODO

El planteamiento de estudio genético de los embriones era el análisis genético en una célula en D3, para la obtención de resultados en D5 y transferencia en fresco en el mismo ciclo de FIV-DGP. En tres de los casos realizados en 2016 (35 en total) fue necesario el reanálisis (8.6% de los ciclos).

Caso 1: DGP-SG-HLA por pareja portadora de déficit de piruvato kinasa con un hijo afecto (c.721G>T / c.203delC gen PKLR). Se realizó biopsia en D3 a 7 embriones de los cuales 2 resultaron afectos, 3 portadores no compatibles y 1 no portador no compatible. Se observó un embrión sin diagnóstico concluyente por presencia de contaminación materna. Este embrión fue rebiopsiado en D5 y se mantuvo en cultivo a la espera de resultado en D6.

Caso 2: DGP-SG-HLA por pareja portadora de drepanocitosis con un hijo afecto (c.20A>T / c.20A>T gen HBB). Se realizó biopsia en D3 a 10 embriones, de los cuales 2 eran afectos, 1 presentaba sólo complemento paterno y 7 fueron rebiopsiados en D5 y vitrificados a la espera de resultado por ausencia de diagnóstico concluyente.

Caso 3: DGP-SG por mujer portadora de MEN II (c.1901G>A gen RET). Se realizó biopsia en D3 de 10 embriones, todos ellos presentaron fallo de amplificación por lo que se realizó rebiopsia en D5 de 9 de los embriones y vitrificación de los mismos a la espera de resultados.

RESULTADOS

En los tres casos se obtuvo información válida de los embriones reanalizados.

Caso 1: El embrión reanalizado resultó ser portador compatible. Se realizó transferencia en D6, con resultado de embarazo clínico (1 saco con LCF+) y parto. Actualmente en estudio para la realización del trasplante de precursores hematopoyéticos.

Caso 2: Se observó diagnóstico concluyente en todos los embriones reanalizados: 1 afecto y 6 portadores o no portadores y no compatibles. No se realizó transferencia.

Caso 3: Se observó diagnóstico de afecto en 6 embriones, y de no afecto en 3 embriones, 2 de los cuales fueron transferidos en un ciclo de criotransferencia posterior con resultado de embarazo clínico en curso (1 saco con LCF+).

CONCLUSIONES

En ciclos de DGP con estudio de una sola célula en D3, es posible el rescate de los embriones sin diagnóstico mediante una nueva biopsia en blastocisto, sin perjuicio de las tasas de embarazo.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-076: IMPACT OF PHYSICAL ACTIVITY IN RELATION TO SEMEN QUALITY AMONG MEN ATTENDING A FERTILITY CLINIC

J. Ibáñez Pérez (1), B. Corcóstegui Ormazabal (1), B. Sántos Zorrozúa (2), R. González Hernández (1), B. García Urbina (1), M. Díaz Núñez (1), R. Matorras Weinig (1)
(1) Cruces Hospital, Human Reproduction Unit, Barakaldo, Bizkaia (2) Department of Genetics, Physical Anthropology and Animal Physiology, Faculty of Medicine and Odontology, University of the Basque Country (UPV/EHU), Spain.

INTRODUCTION

Approximately, about one-half of infertility problems among couples of fertile age are due to the male factor. Several studies have analysed some risk factors related to a decrease in semen quality. However, there is no unanimity whether physical activity is related to semen quality, neither if this relationship is beneficial or detrimental.

OBJECTIVES

This research has been designed to study the relation between physical activity and semen quality with the aim of obtaining enough results to be able to recommend an ideal level of exercises to men attending fertility clinics.

MATERIAL AND METHODS

It is a prospective observational study. Data were collected from May 2016 to February 2017 on 353 patients. Patients were asked to complete the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) before giving the semen sample. They were divided into 4 groups after having calculated the total metabolic equivalents (METs) per week; low (6000 METs).

Male participants (n=353) provided one semen sample and the semen analysis was performed according to the World Health Organization criteria (WHO, 2010). Linear regression was used to examine the correlation of physical activity with semen quality parameters and the analysis of variance (ANOVA) was used to explore the differences in the distribution of semen quality values across the four groups.

RESULTS

Semen parameters were very similar in the four groups of physical activity expressed by means of IPAQ. There were no significant differences concerning ejaculated volume, sperm concentration, progressive motility and sperm morphology in the four IPAQ groups. There was also no correlation between physical activity expressed by IPAQ and any of the aforementioned parameters. However, a non-significant trend was observed towards lower progressive motility and lower sperm morphology as the IPAQ increased.

CONCLUSIONS

It is important to bear in mind that patients attending infertility clinics may differ from the general population. Moreover, other factors such as age, weight, smoking or drug consumption (which could be higher among some high activity men) should have been analysed in order to obtain more accurate results.

This study does not suggest that increasing physical activity could improve sperm quality in men from infertile couples. However, further research is needed to investigate the association between physical activity and semen parameters.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-077: MORFOLOGÍA DE BLASTOCISTOS: BIEN CATALOGADOS, MAL ACUERDO CLÍNICO ENTRE CENTROS Y EXPERTOS

L. Martínez Granados (1), M. Serrano Molina (2), A. González Utor (3), N. Ortíz Piñate (4), M.L. López Regalado (1), V. Badajoz Liébana (5), L. Marqués (6), P. Navas Bastida (1), H. Gutiérrez Rodríguez (1), J.A. Castilla Alcalá (7)
(1) Unidad de Reproducción Humana. UGC Laboratorio Clínico y UGC Obstetricia y Ginecología, HU Virgen de las Nieves. Granada, (2) Clínica IFEM, Córdoba, España, (3) MasVida Reproducción, Sevilla, España, (4) Instituto Europeo de Fertilidad, Madrid, España, (5) GINEFIV, Madrid,España, (6) CRA Clínica Sagrada Familia, Barcelona, España, (7) CEIFER biobanco, Granada, España.

INTRODUCCIÓN

El cultivo hasta el estadio de blastocisto está cada vez más implantado en los laboratorios de reproducción asistida. La evaluación de embriones en día 2 y 3 está muy arraigada y ha demostrado unos acuerdos intra e interobservador aceptables. Sin embargo, la evaluación de embriones de día 5 es significativamente diferente a la de embriones en fases tempranas, debido a la estructura más compleja del blastocisto. Si esta mayor dificultad en la catalogación de blastocistos, tiene un impacto sobre la capacidad de los embriólogos en la identificación del blastocisto idóneo para transferir, no se conoce todavía. Es necesario evaluar las medidas de concordancia interobservador en catalogación y decisión clínica de dichos embriones, ya que un acuerdo pobre, podría llevar a una menor eficacia de las técnicas de reproducción asistida.

OBJETIVO

Evaluar el acuerdo entre los centros y expertos participantes en el Control de Calidad Externo para el laboratorio de reproducción de ASEBIR, en la catalogación y decisión clínica de embriones de día 5.

MATERIAL Y MÉTODO

Se analizan y comparan los datos recogidos en el Control de Calidad Externo de ASEBIR correspondientes a los años 2012-16, en los que participaron una media anual de 48 centros de forma voluntaria (42 en 2012, 39 en 2013, 39 en 2014, 55 en 2015, 67 en 2016). En este control los centros tienen acceso a videos de embriones en día 5 en los que deben valorar, según criterios de catalogación de ASEBIR: masa celular interna, trofoectodermo y catalogación global. Además deben elegir un blastocisto para transferir y decidir sobre aquellos que no transfieren, si los crioconservarían o los descartarían. Se analizan a lo largo de estos 5 años un total de 50 embriones.

Se considera para cada variable analizada, un valor resultado para los centros y otro de referencia. El valor dado por los centros es la categoría más escogida por la mayoría de estos y el valor de referencia se estableció por consenso entre un panel de expertos.

Para valorar la concordancia entre centros y expertos, se calculó: índice Gwet y porcentaje de acuerdo, así como sus intervalos de confianza al 95%.

RESULTADOS

La concordancia entre centros y expertos en catalogación de blastocistos según criterios de ASEBIR fue casi perfecto (Gwet: 0.85 (0.78-0.93)). La característica morfológica del blastocisto que tendió a presentar más discrepancia entre centros y expertos fue la valoración de la masa celular interna (Gwet: 0.72 (0.54- 0.90)), especialmente cuando los expertos consideraban que era de categoría D. Sin embargo en la valoración de la calidad del trofoectodermo se observa una elevada concordancia (Gwet: 0.85 (0.76-0.94)) entre centros y expertos. La concordancia entre centros y expertos en decisión clínica fue moderada y significativamente inferior al observado en catalogación embrionaria (Gwet: 0.57 vs 0.85 $p<0.05$). No se observan diferencias significativas en los porcentajes de acuerdo entre centros y expertos en las distintas opciones de decisión clínica (transferir: 0.70; crioconservar: 0.76; descartar: 0.60)

CONCLUSIONES

La concordancia entre centros y expertos en la clasificación global de un blastocisto no se ve influenciada por el menor acuerdo en la catalogación de la masa celular interna, ya que el peso de la catalogación del trofoectodermo es mayor en la valoración de blastocistos según ASEBIR. La baja concordancia en decisión clínica entre centros y expertos podría reflejar las distintas políticas de transferencia y crioconservación de los laboratorios nacionales.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-078: TRANSPORTE INTERNACIONAL DE OVOCITOS VITRIFICADOS: ANÁLISIS PRELIMINAR DE LA EFICACIA DE LA VÍA TERRESTRE VS. VÍA AEREA

A. Burguera Girau, C. Diez Ridocci, I. Navarro Sanz, I. Ruiz Romero, R. Viñoles Ferreiro, L. Quintero Espinel
Instituto de Medicina Reproductiva (IMER), Valencia.

INTRODUCCIÓN

La vía aérea ha sido tradicionalmente el standard internacional para el transporte de material biológico, incluyendo los gametos. Sin embargo, no han sido valoradas otras vías de transporte transfronterizo, las cuales pueden ser más directas, controlables y requerir menor manipulación. La vía terrestre, efectuada con medios y personal especializados, podría ser una alternativa segura y eficaz para el transporte internacional de gametos.

OBJETIVO

Comparar la eficacia de dos modelos de transporte de ovocitos vitrificados (vía terrestre vs. vía aérea), en el contexto de un programa multicéntrico internacional de donación de óvulos.

MATERIAL Y MÉTODO

Sujetos del estudio: Han sido estudiados un total de 967 ovocitos vitrificados, que son transportados de un país a otro, divididos en dos grupos, en función del sistema de transporte utilizado, Grupo I: (n=697), vía terrestre en nitrógeno líquido y Grupo II: (n=270), vía aérea en fase gaseosa de nitrógeno.

Diseño: Estudio multicéntrico, internacional, retrospectivo y comparativo.

Principales variables de valoración: a) tasa de supervivencia tras descongelación;

b) porcentaje de fecundación por ovocito.

Variable secundaria de valoración a) porcentaje de gestación.

RESULTADOS

El porcentaje de supervivencia tras descongelación fue de un 81,1% en el Grupo I y de un 67,4% en el Grupo II, diferencia que alcanzo significancia estadística.

CONCLUSIONES

El transporte de ovocitos vitrificados, resulta un método eficaz y seguro en el marco de un programa multicéntrico internacional de donación de ovocitos.

En el presente estudio observamos una eficacia superior cuando los ovocitos son transportados vía terrestre en nitrógeno líquido, al menos en lo referente a la supervivencia, lo cual requiere un análisis exhaustivo de los distintos factores que pueden intervenir en este proceso (operador, distancias, duración viaje, etc...).

En lo que respecta a la tasa de gestación, aunque aparentemente superior cuando utilizamos ovocitos transportados vía terrestre en nitrógeno líquido, se debe ser cauto ante estos resultados ya que debido a las múltiples variables que intervienen en este aspecto (calidad espermática, preparación endometrial, etc...), es necesario un análisis más profundo para llegar a obtener datos concluyentes.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-079: LA REVITRIFICACIÓN DE EMBRIONES ES UNA TÉCNICA VÁLIDA EN LOS PROGRAMAS DE CRIOTRANSFERENCIA

P. Sanz Perera, G. Millet Teruel, R. Aurell Ballesteros, M. Moragas Solanes, M.J. Torelló Ybañez
Hospital Quirón Barcelona, Barcelona

INTRODUCCIÓN

La incorporación de nuevas tecnologías en el Laboratorio de FIV permite, por un lado, la vitrificación de manera eficaz y segura de embriones tras un ciclo de Reproducción Asistida y a su vez cultivar los embriones hasta estadio de Blastocito de forma más estable.

En los ciclos de criotransferencia es frecuente que los embriones se encuentren vitrificados en diferentes estadios embrionarios (D+2-D+6). Realizar el cultivo de los embriones desvitrificados hasta el estadio de blastocito previo a la transferencia permite una mejor selección embrionaria y mejores tasas de embarazo.

Dado que no todos los embriones se desarrollan hasta blastocito, es necesario desvitrificar un mayor número de embriones para que la transferencia no se vea comprometida. En algunos casos será necesaria la revitrificación de algún embrión excedente.

Varios estudios han reportado embarazos positivos y niños nacidos sanos tras la revitrificación de embriones biopsiados para Diagnóstico Genético. Asimismo, se han reportado casos de niños nacidos tras la vitrificación de embriones obtenidos a partir de ovocitos vitrificados.

Por otro lado, hay estudios en ratón que detectan alteraciones de genes como Bax o Bcl2 en embriones revitrificados.

OBJETIVO

Estudiar si la transferencia de embriones revitrificados en ciclos de Criotransferencia (CT) afecta la tasa de embarazo, aborto y nacido vivo.

MATERIAL Y MÉTODO

Se ha realizado un estudio retrospectivo observacional de embriones revitrificados y transferidos desde Enero del 2013 hasta Marzo del 2017 procedentes de pacientes de FIV propios y de ovocitos donados. Como grupo control se han utilizado todas las criotransferencias realizadas en el año 2015.

Se han definido dos grupos de análisis. Grupo A: Ciclos con transferencias únicamente de embriones revitrificados (N=25) y el Grupo B (control): Ciclos con transferencias de embriones vitrificados una sola vez (N=215).

Todos los embriones han sido vitrificados, desvitrificados y revitrificados utilizando los medios de Kitazato y el sistema abierto Cryotop.

La valoración embrionaria se ha realizado utilizando el Score ASEBIR. Para el análisis estadístico se han utilizado los programas Excel y SPSS.

RESULTADOS

En el grupo A se realizaron 24 transferencias y se obtuvieron 8 embarazos. En el grupo control B se realizaron 207 transferencias y se obtuvieron 76 embarazos. La media de embriones transferidos fue de 1,29 para el grupo A y 1,69 para el grupo B.

Los dos grupos son comparables en cuanto a la edad de las pacientes en el momento de la punción y el porcentaje de ciclos de CT con Ovodonación.

Las diferencias no son significativas para la tasa de supervivencia tras la desvitrificación (97,3% vs 98,3%). El porcentaje de transferencias en estadio de blastocisto es superior en el grupo A (79,2% vs 38,6%) (p=0.0003).

El porcentaje de embriones de calidad A transferidos es inferior en el grupo A (6,5% vs39,8%) mientras que el porcentaje de embriones C es superior (58,1% vs 28,7%), estadísticamente significativo en ambos casos (p=0.0001 y p=0.018).

La tasa de embarazo por transferencia es similar (33,3% vs 36,7%) con diferencias no estadísticamente significativas (p=0.82).

Tampoco se encuentran diferencias entre ambos grupos para la tasa de aborto (25% vs 23,7%) ni la tasa de niño nacido (16,1% vs 16,0%) (p=1).

CONCLUSIONES

Se puede concluir que, para la muestra analizada, la revitrificación de embriones y su posterior transferencia es una técnica válida y comparable a la técnica de desvitrificación única ya que en ambos procesos se obtienen tasas de embarazo, aborto y nacido vivo similares.

A pesar de transferir embriones de peor calidad en los ciclos de revitrificación, las tasas de embazo no disminuyen.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-080: VITRIFICACIÓN DE BLASTOCISTOS: ¿INFLUYE EL SOPORTE? ¿ES EFICAZ LA TÉCNICA DE COLAPSO?

I. Peinado Casas, M. de la Orden Rodríguez, P. Torres Gómez, P.J. Fernández Colom, P. Polo Sánchez, J.M. Rubio Rubio
Hospital Universitari i Politecnic La Fe, Valencia

INTRODUCCIÓN

Distintos parámetros pueden influir en los resultados de la vitrificación, incluidos la propia técnica y las características del embrión.

La técnica de vitrificación busca la exposición del embrión a altas concentraciones de crioprotectores durante un breve periodo de tiempo, esto se consigue disminuyendo el volumen de preservación y aplicando rampas de enfriamiento ultrarrápidas, de ahí que la utilización del Cryotop vs Cryotip pueda presentar cierta ventaja.

En el caso particular de los blastocistos, cuanto mayor es el grado de expansión previo a la vitrificación peores son los resultados obtenidos con respecto a la re-expansión, proliferación celular e integridad del DNA. Éstos al contener una gran cantidad de líquido en el blastocele merman su posibilidad de supervivencia por una inadecuada criopreservación: disminuye la permeabilidad de los crioprotectores y aumenta el riesgo de formación de cristales. Por ello, la eliminación artificial del líquido del blastocele podría expeler los riesgos inherentes a la vitrificación de blastocistos.

OBJETIVO

Valorar la eficiencia de dos soportes de preservación (cryotip vs cryotop) y la eficiencia del colapso, inducido artificialmente por láser, previo a la vitrificación sobre la tasa de supervivencia (TS), gestación (TG), implantación (TI) y aborto (TA).

MATERIAL Y MÉTODO

Se evaluaron 174 criotransferencias (CT) en estadio de blastocisto realizadas durante el año 2016. 111 CT se vitrificaron en cryotip (Irvine) y 63 en cryotop (Kitazato), en ambos casos según protocolo recomendado por el fabricante. Los blastocistos se obtuvieron a partir de embriones tipo C ó D según clasificación ASEBIR, una vez transferidos y vitrificados en D+2 ó +3 los clasificados como tipo A y B.

Se recogieron los datos correspondientes a la edad, supervivencia embrionaria, número de embriones transferidos, gestación, número de sacos y aborto. El estudio estadístico se realizó mediante Chi-cuadrado y Test-T con el programa informático SPSS18.

RESULTADOS

Se comprobó la homogeneidad de los grupos (p-valor >0.05) con respecto a la edad y al número de embriones transferidos, tanto al comparar TIP/TOP como Colapso/no colapso.

La TS (97.7% (3/111) vs 100% (0/63)); TG (38.7% (43/111) vs 39.7% (25/63)); TI (0.289 ±0.4329 vs 0.299 ±0.4180) y TA (20.9% (9/43) vs 16% (4/25)) no mostraron diferencias significativas al comparar los soportes de vitrificación Cryotip y Cryotop.

Utilizando el soporte Cryotip se comparó los resultados según la realización o no de colapso, no mostrando diferencias significativas ni la TS (100% (0/38) vs 95.8% (70/73)), ni la TA (20% (4/20) vs 22.7% (5/22)). Sin embargo, la TG (52.6% (20/38) vs 31.4% (22/70)) y TI (0.220 ±0.3984 vs 0.450 ±0.4777) evidenció diferencias significativas a favor de la técnica de colapso previo a la técnica de vitrificación (p-valor = 0.031 y 0.019 respectivamente).

CONCLUSIONES

Nuestro estudio demuestra que previo a la vitrificación de blastocistos la eliminación del líquido contenido en el blastocele mediante un pulso con láser incrementa significativamente la tasa de gestación y de implantación, manteniendo las tasas de Supervivencia y Aborto.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-081: METABOLISMO EMBRIONARIO EN ESTADIO DE BLASTOCISTO: ¿QUÉ INFORMACIÓN NOS APORTA LA METABOLÓMICA?

I. Cuevas Saiz (1), S. Arrones Olmo (1), C. Olmedo Illueca (1), A. Genovés Pérez (1), I. Martínez Rodero (1), J.M. Morales Tatay (2), S. Royo Bolea (1), L. Abad de Velasco (1), A. Morales Vicente (1), M. Barea Gómez (1)
(1) Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, (2) Unidad Central de Investigación en Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia

INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha aumentado la búsqueda de nuevos marcadores de viabilidad embrionaria con el fin de seguir aumentado las actuales tasas de recién nacido vivo mediante técnicas de reproducción asistida. Una de las herramientas empleadas para dicho fin es la metabolómica del medio de cultivo embrionario. Hasta la fecha, la literatura resulta bastante controvertida, ya que no se ha conseguido encontrar ningún perfil metabólico capaz de predecir la evolución o posibilidad de implantación de un embrión. En estudios anteriores de nuestro grupo, encontramos un modelo de predicción de implantación en medios analizados en día 2 de cultivo y una correlación entre la capacidad de llegada a blastocisto y la metabolómica del medio en día 3 de cultivo. A pesar de que la metabolómica no ha dado el resultado esperable para la práctica clínica, los trabajos realizados nos aportan información valiosa acerca del metabolismo del embrión. En estadio de blastocisto, se ha demostrado que el metabolismo de los carbohidratos cambia a la utilización de la glucosa por la glicolisis, en la que se genera lactato. Aunque en humanos hay poca bibliografía al respecto, en el resto de especies animales se ha visto que también en estadio de blastocisto hay un cambio en el metabolismo de los lípidos, pudiendo tener éstos relación con la crioresistencia.

OBJETIVO

Analizar el perfil metabolómico del embrión en estadio de blastocisto para buscar una relación entre el metabolismo y otros criterios de selección embrionaria.

MATERIAL Y MÉTODO

Se analizó mediante resonancia magnética nuclear (RMN) el medio de cultivo (Continuous Single Culture Complete, Irvine) dónde se habían desarrollado 48 blastocistos de 38 pacientes, los cuales fueron transferidos y de los que se conoce su estatus implantatorio. Todos los embriones fueron cultivados en un incubador MIRI-TL (ESCO- Medical), con lo que se registraron y pudieron analizar todos los parámetros morfocinéticos de los mismos para su posterior análisis. Los espectros obtenidos tras el análisis fueron procesados y analizados mediante el programa MATLAB. Se realizaron análisis de componentes principales (PCA) y análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLSDA). Se realizó un test t-Student con el paquete estadístico SPSS 15.0v

RESULTADOS

De los 48 medios analizados, se obtuvo una clara separación en dos poblaciones (Grupo 1 y grupo 2) que diferían significativamente en su composición, fundamentalmente en tres regiones del espectro: la perteneciente al lactato (0.075 ± 0.003 vs 0.05 ± 0.01 respectivamente), los lípidos HDL+LDL+VLDL (0.15 ± 0.03 vs. 0.72 ± 0.30) y los lípidos móviles (0.09 ± 0.03 vs. 0.82 ± 0.40). El grado de expansión de los blastocistos pertenecientes a cada uno de los grupos, no presentaba diferencias estadísticamente significativas, aunque sí que se observó una tendencia a una mayor expansión del grupo 1. Los grupos diferenciados no presentaban correlación (p-valor>0.05) con el estatus implantatorio del embrión. Tampoco se correlacionó (p-valor>0.05) dicha separación en dos grupos con la edad de la paciente ni con parámetros morfocinéticos (p-valor>0.05).

CONCLUSIONES

El perfil metabolómico de los embriones cultivados hasta estadio de blastocisto no parece estar relacionado con el estatus implantatorio del embrión. A pesar ello, sí que se encuentran dos poblaciones de embriones que difieren en su metabolismo, basado en el contenido del medio en lípidos y lactato. Esta diferenciación es independiente de la edad de la paciente o de los parámetros morfocinéticos de estadios tempranos del embrión. Las diferencias metabólicas encontradas dependen del grado de expansión de los blastocistos y hacen referencia en primer lugar al consumo de la glucosa por la vía glicolítica, ya que observamos una mayor producción de lactato en los embriones más expandidos. En cuanto a la diferencia en la composición lipídica, ésta podría estar relacionada con la mayor criorresistencia de los blastocistos menos expandidos, en los que encontramos menos contenido lipídico.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-082: ORÍGEN DE LA ANEUPLOIDÍA EN BLASTOCISTOS HUMANOS

E. Toro Toro, M. Palahí Bages, L. Álvarez Gómez, E. Garcia Guixé, E. Alsina Xiol, M. de Acha Gual, D. Campos Rodero, E. Balius Fort, M. Sandalinas Alabert, C. Giménez Sevilla
Reprogenetics Spain, Barcelona

INTRODUCCIÓN

Las anomalías cromosómicas numéricas son habituales en embriones humanos preimplantacionales in vitro. Por ello, la optimización de resultados en ciclos de DGP para enfermedades hereditarias (DGP-SGD) debe incluir también la selección de embriones cromosómicamente normales. La técnica de Karyomapping (Illumina), utilizada en el DGP de enfermedades hereditarias, realiza un diagnóstico por ligamiento y a su vez, permite observar ciertas aneuploidías y determinar su origen. La combinación de este método cualitativo junto con técnicas cuantitativas como la secuenciación masiva (NGS, Veriseq, Illumina) resulta la mejor estrategia a seguir en ciclos de DGP-SGD.

OBJETIVO

Evaluar la detección de anomalías cromosómicas numéricas mediante la técnica de Karyomapping e investigar el origen, incidencia y tipología de las aneuploidías observadas en blastocistos en ciclos de DGP-SGD en parejas fértiles portadoras de enfermedades genéticas.

MATERIAL Y MÉTODO

Se incluyen en el estudio muestras de trofoectodermo de 40 blastocistos procedentes de 13 ciclos de DGP-SGD. La media de edad materna en este estudio es de 34,6 años. Las muestras se amplifican con el método de desplazamientos múltiples (SureMDA, Illumina) y el producto obtenido se procesa para: 1) realizar la técnica de Karyomapping para el estudio de la enfermedad hereditaria y 2) estudiar las aneuploidías mediante NGS, ya sea por indicación clínica o por re-análisis de embriones afectos en ciclos de solo DGP-SGD mediante Karyomapping.

Se comparan las aneuploidías detectadas en función de la técnica de análisis. Los embriones se clasifican según la presencia o ausencia de aneuploidías y se evalúa la concordancia del diagnóstico obtenido en ambas técnicas para cada embrión. La combinación de ambas técnicas permite establecer el origen de las aneuploidías observadas, la incidencia y la tipología.

RESULTADOS

Todas las aneuploidías observadas mediante Karyomapping (n=65) se confirmaron mediante NGS. La aplicación en exclusiva de la técnica de Karyomapping permite detectar el 79,2% de los eventos aneuploides observados mediante NGS (n=82), correspondientes al 78.8% de los embriones aneuploides.

El 65% de los embriones analizados presentaban aneuploidías mediante ambas técnicas. Respecto al 35% de embriones en el que no se detectó ninguna alteración mediante Karyomapping, un 17,5% se confirmó como euploide mediante NGS y el 17,5% restante presentó un diagnóstico discordante (no se detectaron anomalías cromosómicas numéricas mediante Karyomapping pero sí mediante NGS).

El análisis de las aneuploidías observadas revela que el 74,4% de las anomalías cromosómicas detectadas son meióticas (n=61) frente a un 25,6% de anomalías de origen mitótico (n=21). Respecto a la contribución de los gametos en la aneuploidía, se ha observado que los errores meióticos son mayoritariamente de origen materno y que en su mayoría se asocian a la pérdida o ganancia del cromosoma completo. La aneuploidía debida a pérdidas o ganancias parciales del cromosoma supone un 9,8% de los errores meióticos y un 33,3% de los errores mitóticos.

CONCLUSIONES

Según nuestros resultados preliminares,la aplicación exclusiva de Karyomapping en ciclos de DGP para enfermedades genéticas permite detectar la mayoría de los embriones aneuploides. Si bien, para poder establecer el diagnóstico de euploidía, es necesario complementar el análisis de la muestra con una técnica validada para la detección de aneuploidías.

La mayoría de las aneuploidías detectadas en blastocistos se deben a errores meióticos en el ovocito que conllevan la pérdida o ganancia del cromosoma completo. Del mismo modo, los resultados obtenidos muestran que la presencia de anomalías cromosómicas parciales es mayoritariamente de origen mitótico.

Los resultados de este estudio confirman la presencia de un importante porcentaje de embriones aneuploides incluso en parejas fértiles. Ante estos resultados y con el objetivo de ofrecer las mayores garantías de éxito en un ciclo de FIV-DGP para enfermedades monogénicas, se debería incluir sistemáticamente la detección de aneuploidías en este tipo de análisis.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-083: DIFERENCIAS EN LAS TASAS DE ANEUPLOIDÍAS ENTRE DISTINTOS CENTROS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

N. Al-Asmar Piñar (1), A. Akinwole (2), C. Cinniouglu (2), L. Rodrigo Vivó (1), S. García Herrero (1), M. Riboldi (3), M. Clemente (1), C. Rubio Lluesa (1)
(1) Igenomix España, (2) Igenomix USA, (3) Igenomix Brasil

INTRODUCCIÓN

El DGP-A (Diagnóstico Genético Preimplantacional-Aneuploidías) ha demostrado ser una técnica fiable, segura y positiva para pacientes con ciertas indicaciones, como puedan ser la edad materna avanzada (EMA) (1,2), fallos de implantación repetido (FI) (2), aborto recurrente (AR) (2), factor masculino (FM) (2) o cromosomopatía previa (CP) (2,3).

OBJETIVO

El objetivo de este estudio es comparar los resultados entre distintos centros para ver si existen diferencias en los resultados cuando realizan biopsia embrionaria en estadio de blastocisto y posterior estudio de PGS.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio retrospectivo realizado entre Enero de 2015 y Diciembre del mismo año, participando 6 Clínicas alrededor del mundo. Se analizaron embriones en estadio de blastocisto, en día 5 o día 6 de desarrollo. El método de análisis fue aCGH (Illumina).

RESULTADOS

Tabla 1. Estudio de aneuploidías de biopsias realizadas en estadio de blastocisto (D5 o D6). Comparación entre Clínicas.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran diferencias significativas en términos de aneuploidía entre algunos de los centros. Estas diferencias se podrían explicar por particularidades de cada centro en la selección de pacientes, estimulación ovárica, condiciones de cultivo, elección de embriones para biopsia y método de biopsia embrionaria. Estos resultados están en consonancia con otros estudios realizados, en este caso con pacientes de ovodonación (4).

BIBLIOGRAFÍA

(1) In vitro fertilization with preimplantation genetic diagnosis for aneuploidies in advanced maternal age: a randomized, controlled study. Rubio C, Bellver J, Rodrigo L, Castillón G, Guillén A, Vidal C, Giles J, Ferrando M, Cabanillas S, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Fertil Steril. 2017 Apr 19. pii: S0015-0282(17)30254-6. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.03.011.

(2) New tools for embryo selection: comprehensive chromosome screening by array comparative genomic hybridization. Rodrigo L, Mateu E, Mercader A, Cobo AC, Peinado V, Milán M, Al-Asmar N, Campos-Galindo I, García-Herrero S, Mir P, Simón C, Rubio C. Biomed Res Int. 2014;2014:517125. doi: 10.1155/2014/517125. Epub 2014 Apr 29.

(3) Chromosomal abnormalities in embryos from couples with a previous aneuploid miscarriage.Al-Asmar N, Peinado V, Vera M, Remohí J, Pellicer A, Simón C, Hassold T, Rubio C. Fertil Steril. 2012 Jul;98(1):145-50. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.03.035. Epub 2012 Apr 21.

(4) Euploidy rates in donor egg cycles significantly differ between fertility centers. Munné S, Alikani M, Ribustello L, Colls P, Martínez-Ortiz PA; Referring Physician Group., McCulloh DH. Hum Reprod. 2017 Apr 1;32(4):743-749. doi: 10.1093/humrep/dex031.

	Centros	1	2	3	4	5	6	p-value
Trofoectodermo	Edad (DE)	37.5 (3.8)	37.2 (3.8)	37.1 (4.2)	37.3 (3.8)	38.0 (4.8)	38.6 (2.3)	ANOVA
	Embriones Informativos (%)	672 (98.4)	461 (97.7)	581 (95.7)[a]	1.720 (96.8)[b]	1.060 (99.3)[abc]	263 (96.3)[c]	p<0.01
	Normales (%)	320 (47.6)[ab]	193 (41.9)	251 (43.2)	693 (40.3)[a]	421 (39.4)[b]	107 (40.7)	p=0.02
	Anormales Totales (%)	352 (52.4)[cd]	268 (58.1)	330 (56.8)	1.028 (59.8)[c]	647 (60.6)[d]	156 (59.3)	p=0.02
	Anormal (1 o 2 aneuploidías) (%)	344 (51.2)[e]	260 (56.4)	318 (54.7)	1003 (58.3)[e]	596 (55.8)	155 (58.9)	p<0.05
	Anormal Complejo (3 o más aneuploidías) (%)	8 (1.2)[f]	8 (1.7)	12 (2.1)	17 (1.0)[g]	51 (4.8)[fgh]	1 (0.4)[h]	p<0.05

Tabla 1. Estudio de aneuploidías de biopsias realizadas en estadio de blastocisto (D5 oD6). Comparación entye clínicas

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-084: SCREENING GENÉTICO MEDIANTE CARRIER-MAP EN DONANTES DE GAMETOS

L. Carretero Vilarroig, A. Gómez Duro, S. Modamio Hoybjor, E. Martín Tejedor, E. Fernández García
Geniality Diagnóstico Genético, Madrid

INTRODUCCIÓN

El Screening genético en donantes de gametos tiene como finalidad reducir el riesgo de trasmisión 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. En el punto IV del Anexo 1 del Proyecto Real Decreto donantes 30 Junio 2015_VF se recomienda realizar el estudio de portadores de enfermedades genéticas de acuerdo al conocimiento científico y a la prevalencia conocida en la etnia del donante. Al menos deben incluir para receptoras españolas: a) Fibrosis Quística; b) Atrofia muscular espinal; c) Hipoacusia (alteración DFNB1); d) X frágil (obligatorio en donantes de ovulos) . Las distintas organizaciones y sociedades internacionales (Organización Mundial de la Salud, American Society for Reproductive Medicine, American College of Obstetricians and Gynecologists, 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.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio, es evaluar los resultados tras la inclusión del test genético Carrier-Map de Recombine en los programas de donación de gametos junto con el Matching genético.

MATERIAL Y MÉTODO

Entre Diciembre-2015 y Mayo-2017, se estudiaron 220 donantes de ovocitos con una edad media de 24,6 años. Las procedencias fueron: Europa (205), Latino Americano (9), Africano (1), y no referido (5). 78 pacientes cumplimentaron además un cuestionario de asesoramiento genético que permitió valorar su procedencia geográfica familiar, historia clínica personal y familiar, así como la recomendación de una serie de estudios. Pasado este primer filtro, se realizaron dos pruebas de manera rutinaria: Cariotipo (104 donantes) y Screening de 33 enfermedades recesivas y ligadas al sexo mediante el panel Recombine Illumina's Infinium HD Genotyping Platform (219 donantes).

RESULTADOS

De las 220 donantes incluidas en el estudio, 208 (94%) resultaron aptas para la donación de gametos mientras que 12 (5%) recibieron un resultado de No apta. De todas ellas, 1 (0,22%) resultó no apta tras la evaluación del cuestionario de asesoramiento genético (n=78), por antecedentes de diabetes mellitus tipo II, y 2 donantes (0,22%) tras el estudio del cariotipo (n=104): 46,XX, inv(9)(p12q21 y 46,XX,22cen-1. El Screening genético dió resultado positivo en 19 donantes (8,7%): 9 de ellas (4,1%) portadoras de X-frágil, siete con un alelo intermedio (3 casos de 45 repeticiones CGG, 2 casos con 46, 1 caso con 48, 1 caso con 49) y dos casos de premutación (con 53 repeticiones CGG), considerándose todas ellas como no aptas. 5 donantes (2,3%) resultaron portadoras de Fibrosis Quística (2 F508del; 1 c.2051_2052delAAinsG; 1 c.2657+5G>A y 1 c.164+12T>C), 1 donante (0,5%) portadora de Beta Talasemia y 4 (1,8%) donantes portadoras de Atrofia Muscular espinal (AME), siendo consideradas como No aptas o aptas para matching genético.

CONCLUSIONES

En nuestra experiencia anterior a la incorporación del Recombine, la tasa de donantes no aptas tras el estudio de Fibrosis Quística, Atrofia Muscular espinal (AME) , X frágil, cariotipo y el cuestionario genético era del 11,4%. Actualmente son consideradas no aptas aquellas donantes portadoras de una enfermedad dominante y/o recesiva ligada al sexo, mientras que las candidatas portadoras de alguna otra enfermedad recesiva tiene la opción de incluirse en el grupo de test de compatiblidad genética o matching con la pareja de la receptora. Esta nueva forma de cribar las donantes nos ha permitido disminuir la proporción de donantes No aptas a casi a la mitad (5%).

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-085: VALOR PREDICTIVO DE LA DETERMINACIÓN DE HORMONA ANTIMÜLLERIANA EN LOS RESULTADOS DE LOS CICLOS DE FIV

F. Blanco Rodríguez, M.D. Lozano Arana, B. Sánchez Andújar, J.C. García Lozano, J. Guisado Fernández, M. Ferro Conde, I. Domínguez Pascual, G. Antiñolo Gil
Hospital Virgen del Rocío, Sevilla

INTRODUCCIÓN

La hormona antimülleriana (AMH) es una glicoproteína dimérica de la super familia de los factores de crecimiento y diferenciación tipo ß sintetizada por las células de la granulosa de los folículos preantrales y antrales pequeños, que puede ser detectada y medible en la circulación sanguínea, y que se utiliza como marcador de reserva ovárica. Existen distintos métodos de laboratorio para cuantificar los niveles de AMH. Estos niveles han demostrado en diferentes estudios buena correlación con el número de ovocitos recuperados en los ciclos de FIV, pudiendo utilizarse como marcador de baja respuesta.

OBJETIVO

Analizar el valor predictivo de la determinación de AMH en los resultados de los ciclos de FIV en nuestra práctica clínica, elaborando para ello la curva ROC, y establecer el punto de corte como marcador de baja respuesta en base a ella.

MATERIAL Y MÉTODO

Análisis retrospectivo de los ciclos de FIV realizados entre enero de 2015 y junio de 2016 en 307 pacientes a las que se había realizado la determinación de AMH en el estudio previo al inicio del ciclo. A priori ninguna paciente cumplía criterios de baja reserva ovárica según criterios de Bologna. Se estableció como definición de baja respuesta la recuperación de ≤ de 3 ovocitos en el ciclo de FIV. La determinación de AMH se realizó con el método Elecsys® AMH de Roche.

RESULTADOS

Se analizaron 307 ciclos de FIV. La edad media de las 307 pacientes fue de 34,64 años (error típico de la media de 0,203). El valor medio de AMH fue 2,142 ng/ml, con un error típico de la media de 0,103 (valor mínimo 0,035 ng/ml; valor máximo 11,420 ng/ml). El número medio de ovocitos recuperados fue de 9,53 (error típico de la media 0,346), con un mínimo de 0 y un máximo de 31. La curva ROC de la AMH para detectar baja respuesta mostró un área bajo la curva de 0,822, estableciendo un punto de corte en 1,115 ng/ml para una sensibilidad del 77,4% y una especificidad del 74%.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio muestran que la AMH es un buen predictor de baja respuesta ovárica en la práctica clínica, con un punto de corte ≤ 1,115 ng/ml.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-086: UMBRAL DE EDAD EN EL VARÓN INFÉRTIL PARA LOS CAMBIOS EN LOS PARÁMETROS SEMINALES

B. Freijomil Díaz, A. Munuera Puigvert, S. Novo Bruña, A. García Faura, F. García José, M. López- Teijón
Institut Marquès, Barcelona

INTRODUCCIÓN

En la mayoría de los países occidentales, la edad media de los padres ha aumentado y una proporción significativamente mayor de hombres ahora son padres a partir de los 50 años.

Es conocido que con la edad se producen cambios en el testículo, apareciendo signos de degeneración de la espermatogénesis que generalmente se encuentran en áreas relativamente pequeñas, difusamente distribuidas y cuya frecuencia varía entre individuos. La función endocrina testicular también se ve afectada con la edad, produciéndose una disminución de las células de Leydig y en consecuencia una disminución de la testosterona sérica y de la testosterona libre, que disminuyen a partir de los 50 años un 0,4% y un 1,2% por año respectivamente. Muchos estudios han evaluado los cambios en el seminograma con respecto a la edad, sugiriendo una disminución del volumen de semen, del porcentaje de espermatozoides móviles y del porcentaje de espermatozoides con morfología normal. La alteración de estos parámetros puede ser secundaria a los cambios relacionados con la edad en la función del epidídimo, la próstata y las vesículas seminales. Sin embargo, no hay datos consistentes que confirmen que el recuento total de espermatozoides disminuye significativamente con la edad. La fecundidad de la mujer disminuye gradualmente, comenzando de forma significativa aproximadamente a los 32 años y disminuyendo más rápidamente después de los 37 años. Contrariamente, en el varón no se han establecido los umbrales de edad a partir de los que se produce el deterioro de los parámetros seminales.

OBJETIVO

Los objetivos de este estudio son evaluar si la edad del varón afecta al recuento total de espermatozoides en el eyaculado, al volumen y a la movilidad espermática progresiva. También, detectar si existe un umbral de edad en el que se produzca el deterioro de estos parámetros seminales.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio de cohorte retrospectivo que analiza los datos de 13.875 seminogramas de hombres que acudieron a nuestro Centro de Reproducción Asistida entre los años 2007 y 2017. Se establecen 4 grupos etarios atendiendo a la edad del varón el día del seminograma. Grupo I: menores de 29 años (n=515); Grupo II: de 30 a 39 años (n=6802); Grupo III: de 40 a 49 (n=5586) y Grupo IV: más de 50 (n=972). Se evalúa la relación entre grupos de los siguientes parámetros: volumen, porcentaje de movilidad progresiva y número total de espermatozoides en eyaculado. Se utilizan los estadísticos no paramétricos Krustal-Wallis y Mann-Whitney para medir dichas diferencias.

RESULTADOS

Se observan diferencias estadísticamente significativas entre grupos para la mediana de los siguientes parámetros:

i) Volumen: Grupo II: 3,1 (0,2-13,4) vs Grupo III: 2,8 (0,1-15), ($p<0,01$); ii) porcentaje de movilidad progresiva: Grupo II: 49,24 (0-100) vs Grupo III: 46 (0-100), ($p<0.01$) y iii) número total de espermatozoides en eyaculado: Grupo II: 122,4 (0-3064,5) vs Grupo III: 115,2 (0-1902,8), ($p<0,01$).

Los tres parámetros se observan disminuidos a partir de los 39 años, ($p<0,01$).

CONCLUSIONES

Nuestros resultados coinciden con los publicados por otros autores, confirmando que existe una relación inversamente proporcional entre volumen seminal y movilidad progresiva espermática con la edad. Además, encontramos una disminución significativa del recuento total de espermatozoides con la edad y que los 39 años es el umbral de edad en el que empiezan a disminuir los tres parámetros. Son necesarios estudios prospectivos que corroboren estos resultados.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-087: ¿HAY VENTAJAS EN TRANSFERIR EN D+5 RESPECTO DE LA TRANSFERENCIA EN D+2/D+3 CON CONGELACIÓN DE EMBRIONES?

J. Cuadros Fernández, L. Andrés Criado, M. Morales Morales, Mª Á. Manzanares Ruiz, E. Ricciarelli
Clínica FIVMadrid, Madrid

INTRODUCCIÓN

Se suele considerar que la transferencia en fresco en día 5 (D+5) presenta una tasa de embarazo clínico superior a la de la transferencia en fresco en días 2 o 3 (D+2/D+3). Este hecho, siendo cierto, no suele tener en cuenta que en las transferencias en D+2/D+3 es frecuente que se congelen embriones; por lo tanto, el éxito del ciclo debería ser calculado basándose en la probabilidad de embarazo acumulada con la descongelación de los embriones.

OBJETIVO

Comparar la tasa de gestación clínica acumulada (transferencia en fresco + transferencia en descongelación) en los ciclos en los que la transferencia se realizó en D+2/D+3 y se congelaron los embriones supernumerarios de buena calidad, con la tasa de gestación clínica acumulada de los ciclos en los que la transferencia se realizó en D+5 y se congelaron los embriones supernumerarios de buena calidad.

MATERIAL Y MÉTODO

De enero a diciembre de 2016 se analizaron 124 ciclos considerados de buen pronóstico, dado que hubo congelación de embriones; en estos ciclos se eligió transferir los embriones en D+2/D+3 y congelar los embriones supernumerarios de buena calidad, y se calculó la tasa de gestación clínica acumulada. De la misma manera, durante este periodo, se calculó la tasa de gestación clínica acumulada en 19 casos en los que se realizó la transferencia en D+5, congelando los embriones supernumerarios de buena calidad. Se compararon las tasas de gestación clínica acumulada mediante el test Chi-cuadrado.

RESULTADOS

De los 124 ciclos con transferencias en D+2/D+3, 58 pacientes quedaron embarazadas en la transferencia en fresco, y 24 más en las descongelaciones, haciendo un total de 82 embarazos clínicos (66,1%). De los 19 ciclos en los que se transfirió en D+5, 12 pacientes quedaron embarazadas en la transferencia en fresco, y una más en la descongelación, con un total acumulado de embarazos clínicos de 13 (68,4%). No hubo diferencias estadísticamente significativas.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados avalan que, para el éxito de un ciclo de FIV-ICSI, no hay diferencias significativas entre elegir la transferencia en fresco de los embriones en D+2 o D+3, y congelar los embriones de buena calidad, o la transferencia en D+5 y congelar los embriones de buena calidad.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-088: LA MULTINUCLEACIÓN NO ES UN FACTOR NEGATIVO EN LA PREDICCIÓN DE IMPLANTACIÓN DE BLASTOCISTOS CON BUENA CALIDAD MORFOLÓGICA

J. Massó Hernáez, S. Novo Bruña, C. Castelló Zupanc, S. Rovira Fontanals, L. Cortada Cadena, M. López-Teijón
Instituto Marques, Barcelona

INTRODUCCIÓN

La presencia de blastómeras multinucleadas en las primeras divisiones embrionarias se ha asociado a bajas tasas de formación de blastocisto y de implantación, y al incremento de anomalías cromosómicas y abortos. No obstante, son varios los casos documentados donde embriones multinucleados implantan, e incluso dan lugar a niños nacidos sanos (Balakier, 2016). Las hipótesis que se barajan son que algunos embriones multinucleados son capaces de reparar y/o derivar las células afectas a tejidos extra-embrionarios, logrando así una gestación que capaz de llegar a término con un nacido.

OBJETIVO

Valorar si la multinucleación en estadios celulares posteriores a dos células es un factor predictivo para determinar la tasa de implantación de blastocistos con buena calidad morfológica.

MATERIAL Y MÉTODO

Este estudio engloba casos llevados a cabo entre enero del 2014 y marzo del 2017. Solo se han incluido ciclos de transferencia de blastocisto único donde los embriones fueron cultivados en medio Global (LifeGlobal).

Los embriones en estadio de tres o más células que en día 2 y/o 3 presentaban más de 2 núcleos en como mínimo una blastómera fueron clasificados como embriones multinucleados. Mientras que para establecer la categoría de blastocistos de buena calidad se tuvo en cuenta que el grado de expansión fuera ≥3, la calidad de su masa celular interna ≥B y la del trofoectodermo ≥B según la clasificación de Gardner.

Se compararon las tasas de formación de blastocistos de buena calidad entre embriones multinucleados y no multinucleados, así como las tasas de embarazo, de implantación, de niño nacido y de aborto, resultantes de la transferencia de un único blastocisto de buena calidad.

RESULTADOS

Todos los embriones incluidos en este estudio procedían de ovocitos de pacientes con una edad media de 28,1 años. El 80,3% de los embriones cultivados llegaron al estadio de blastocisto, de los cuales sólo el 8,1% procedían de embriones multinucleados. El 60,6% de los embriones no multinucleados fueron capaces de generar blastocistos de buena calidad y sólo el 21,3% de los embriones multinucleados lo lograron, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

En total se estudiaron 4020 transferencias de blastocisto único de buena calidad. Entre ellas, las transferencias de blastocistos multinucleados representaron el 2,04%. Del total de transferencias realizadas con embriones no multinucleados, el 58,8% se transfirieron en fresco y el 41,2% en criotransferencias. En cuanto a los embriones multinucleados el 30,5% de los embriones se transfirieron en fresco y el 69,5% en criotransferencias.

Finalmente, no observamos ninguna diferencia significativa al comparar las tasas de embarazo, de implantación y de niño nacido entre transferencias de blastocisto único de buena calidad multinucleados y no multinucleados. No obstante, sí que detectamos un incremento en la tasa de aborto por embarazo clínico en blastocistos multinucleados, aunque sólo fue estadísticamente significativo en transferencias en fresco (incremento del 20,8%; $p<0,05$).

CONCLUSIONES

Hasta el momento, en nuestro laboratorio la multinucleación ha sido un factor negativo para la selección del embrión a transferir. De hecho, no se transfieren embriones multinucleados, aunque su calidad sea superior, si disponemos de embriones evolutivos no multinucleados.

No obstante, las evidencias que hemos detectado muestran como el cultivo largo promueve un sesgo para la selección de los embriones multinucleados, siendo los blastocistos de buena calidad morfológica de similar potencial a los no multinucleados. De este modo concluimos que los blastocistos de buena calidad procedentes de embriones multinucleados no deberían ser descartados, y si no se transfieren por tener disponibles embriones no multinucleados, deberían ser vitrificados.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-089: ASESORAMIENTO GENÉTICO Y MOSAICISMO EMBRIONARIO: CONDITIO SINE QUA NON

C. Giménez Sevilla, E. García Guixé, E. Toro Toro, M. Sandalinas Alabert
Reprogenetics, Barcelona

INTRODUCCIÓN

La irrupción de la secuenciación masiva (NGS) para el cribado de aneuploidías en biopsias de blastocisto (PGD-AS), ha supuesto la detección fiable de embriones con una dotación cromosómica en mosaico. Este diagnóstico supone un enorme desafío para embriólogos y clínicos en relación a cómo actuar ante un resultado de esta índole. ¿Debemos transferir/almacenar los blastocistos mosaico? ¿Qué posibilidades de embarazo ofrece la transferencia de estos embriones? ¿Cómo asesorar a los pacientes en relación a la posibilidad que alguno o todos sus blastocistos sean mosaico?

OBJETIVOS

Incentivar, considerando los datos existentes, la reflexión acerca de los diferentes posicionamientos en cuanto a la transferencia/almacenamiento, o no, de embriones humanos con un perfil mosaico provenientes de ciclos de PGD-AS.

MATERIAL Y MÉTODOS

Datos aparecidos en la literatura científica (Fragouli et al., 2017; Greco et al., 2015; Munné et al., 2017) en relación a los resultados clínicos obtenidos de la transferencia de embriones preimplantacionales humanos provenientes de ciclos de PGD-AS.

RESULTADOS

Los datos aparecidos en la literatura científica hasta el momento, muestran una tasa de blastocistos mosaico de alrededor del 30% cuando se utilizan técnicas de NGS de alta resolución (hr-NGS). La proporción de células aneuploides detectadas en este tipo de embriones oscila entre el 20 y el 80%. Así mismo, podemos distinguir diferentes tipos de blastocistos mosaico en función de la proporción de células aneuploides, el número de cromosomas involucrado, si se trata de una ganancia o pérdida de todo o parte de un cromosoma o de que cromosoma/s está/n involucrado/s. A pesar de que los datos clínicos resultantes de la transferencia de estos embriones son todavía preliminares, la evidencia acumulada sugiere que los blastocistos mosaicos implantan menos y abortan más que los blastocistos euploides, si bien, hay que decir que también son capaces de dar lugar a recién nacidos vivos sanos.

CONCLUSIONES

Teniendo presentes los datos expuestos y las posibilidades que ofrecen las nuevas tecnologías genómicas, los centros de reproducción asistida que quieran permanecer o alcanzar los mayores estándares de calidad y servicio, deben plantearse cuál va a ser su actitud ante los nuevos retos que ya están presentes en nuestro día a día. El primer planteamiento debería ser decidir cuál va a ser su política en cuanto a transferir/almacenar o no blastocistos mosaico y transmitirla a sus pacientes. El segundo, debería ser la incorporación del asesoramiento genético pre y post-test a todas las parejas a las que se indique un PGD-AS mediante técnicas de hr-NGS.

Durante el asesoramiento pre-test, entre otros aspectos, deberemos informar a los pacientes de los beneficios, los riesgos y las limitaciones de la técnica. También deberemos especificar cuáles son los posibles resultados, incluyendo la limitada información actualmente disponible en relación a los blastocistos mosaico. Nuestro objetivo debe ser que los pacientes entiendan el proceso, para que puedan tomar una decisión informada en cuanto realizarse o no un PGD-AS mediante hr-NGS.

Realizado el PGD-AS y antes de la transferencia, debemos revisar los resultados obtenidos con los pacientes y asesorarlos. La transferencia de un blastocisto mosaico debería ser únicamente planteable en ausencia de embriones euploides. Para aquellos pacientes que, a pesar de la menor tasa de implantación, acepten la transferencia de un blastocisto mosaico, se debe enfatizar un mayor riesgo de aborto y un riesgo no conocido de anomalías fetales o neo-natales. Por ello, en caso de transferencia y ante la posible ocurrencia de embarazo, se debe asesorar en relación a los beneficios, riesgos y limitaciones del diagnóstico prenatal. Así mismo, debemos explicar la experiencia actual en relación a los resultados obtenidos hasta el momento con la transferencia de blastocistos mosaico.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-090: IMPORTANCIA DE LOS COMITÉS DE ÉTICA EN LOS CENTROS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

R. Nuñez Calonge, S. Cortés Gallego, L. Ortega López, P. Caballero Peregrín
Clínica Tambre, Madrid

INTRODUCCIÓN

El continuo desarrollo de las técnicas de Reproducción Asistida (RA) ha originado complejos debates éticos relacionados con sus aplicaciones. El principio de beneficencia obliga a los especialistas a maximizar el cuidado clínico sobre los daños potenciales. El principio de autonomía, obliga al profesional a respetar los derechos de autodeterminación de los pacientes. Sin embargo, en ocasiones, estos dos principios pueden entrar en conflicto cuando los profesionales deben establecer límites a los pacientes. En estos casos, y otros en los que se originan controversias en la toma de decisiones, los Comités de Ética son fundamentales para ayudar a resolver estos problemas.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es demostrar la importancia de un Comité de Ética asistencial en reproducción asistida tras 10 años de experiencia en un centro privado.

MATERIAL Y MÉTODO

En el año 2006 se estableció un Comité de Ética Asistencial en un centro privado español, cuyo fin era la asistencia a parejas infértiles. Se obtuvo la aprobación y acreditación correspondiente tanto a nivel local como nacional. Su principal objetivo era el análisis y recomendaciones sobre conflictos éticos que ocurren en el marco de la práctica asistencial relacionada con la reproducción humana. El fin último es mejorar la calidad del cuidado y la protección de los derechos de los pacientes.

El Comité está formado por 12 personas, de las cuales, 4 son expertos en Bioética, dos expertos en leyes, dos psicólogos, una enfermera, un responsable de atención al paciente, dos embriólogos y dos ginecólogos. Las reuniones se realizan mensualmente, y en ellas se discuten los casos que han originado algún conflicto ético en reproducción asistida. Para ello se sigue el método deliberativo que consiste en: presentación del caso por parte tanto de un profesional de la clínica como de otro centro (hechos clínicos relacionados con el mismo), identificación de los valores en conflicto, examen de los cursos extremos, análisis de los cursos intermedios y finalmente decisión del curso óptimo de acción. Las recomendaciones que se derivan se envían por escrito a la persona que ha tenido el conflicto.

En el caso de que haya casos que resolver con urgencia, se realizan reuniones inmediatas para su deliberación.

RESULTADOS

Desde 2006 a 2016 se han evaluado un total de 98 casos, en los cuales se han emitido recomendaciones en todos ellos. De estos, se ha recomendado no realizar ninguna técnica de reproducción asistida en 35 de ellos.

Se han debatido diversas cuestiones éticas relacionadas con la RA, incluyendo: nuevos modelos familiares, consentimiento informado, nuevas tecnologías genéticas, embarazo múltiple, factores sociales, estatus del embrión, destino de embriones criopreservados y comercialización de la reproducción, así como temas legales.

El aspecto más importante a considerar ha sido siempre el bienestar del futuro niño.

CONCLUSIONES

Se ha comprobado la importancia de la existencia de un Comité de Ética Asistencial en reproducción asistida, tanto por la ayuda en la toma de decisiones en la práctica clínica a todos los profesionales implicados, como en la mejora del cuidado de la atención al paciente, así como evitando en algunos casos la realización de técnicas que hubieran sido perjudiciales para el futuro niño.

La incorporación de un Comité de Ética en todas las unidades de reproducción asistida, podría mejorar la efectividad del cuidado en las mismas.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-091: VARIACIÓN DE LOS NIVELES DE LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA EN RELACIÓN A LA TOMA DE ANTICONCEPTIVOS ORALES

M. Ferro Conde, B. Sánchez Andujar, M.D. Lozano Arana, J.C. García Lozano, F. Blanco Rodríguez, J. Guisado Fernández, I. Domínguez Pascual, G. Antiñolo Gil
Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla

INTRODUCCIÓN

La hormona antimülleriana (AMH) es un homodímero glicoproteico que forma parte de la super familia del TGF- ß (Transforming Growth Factor- ß). Es producida por las células de la granulosa de los folículos primordiales, preantrales y antrales pequeños y puede ser detectada y medida en la circulación sanguínea. Según distintos estudios, sus niveles en sangre no se verían modificados por el ciclo ovárico, ni por la administración de esteroides exógenos, ni durante el embarazo, por lo que representa un buen marcador de reserva ovárica.

OBJETIVO

Comprobar el efecto de los anticonceptivos hormonales orales (ACHO), utilizados para la programación de los ciclos de FIV, sobre los niveles de AMH antes, durante y después de la toma de los ACHO.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio prospectivo realizado entre marzo y Julio de 2016. Se incluyeron aquellas pacientes que iban a iniciar un ciclo FIV y cuyo ciclo se programó con la toma de ACHO al menos durante un mes previo al inicio de la estimulación ovárica. Se determinó los niveles de AMH en sangre periférica antes, durante y 5 días después de la toma de ACHO mediante la técnica Elecsys® AMH de Roche.

El análisis estadístico de la diferencia de las medias se realizó mediante la prueba no paramétrica de Friedman.

RESULTADOS

Completaron el estudio 38 pacientes, edad media 32,5 años, media de utilización de ACHO de 67.2 días. La media de la AMH antes, durante y después de la toma de ACHO fue de 2.20, 1.80 y 1.69 (p=0,078).

CONCLUSIONES

Nuestros resultados no permiten confirmar que la toma de ACHO influya en los niveles de AMH, aunque se obtuvieron niveles más bajos después de la toma de ACHO (p=0.078).

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-092: SPERM TOTAL MOTILITY (TM) AS A PREDICTOR OF THE PERCENTAGE OF VIABLE SPERMATOZOA OBTAINED BY HOS-TEST: NOVEL METHOD TO EVALUATE SPERM VIABILITY

I. Molina Botella (1), A. Palomar Rios (1), J.V. Martínez Sanchis (1), A. Gascón Sánchez (1), M.J. Soriano Ortega (1), S. Balasch Parisi (2), J.M. Rubio Rubio (1)
(1) Unidad de Reproducción Asistida, Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, Valencia, España, (2) Departamento de Estadística e Investigación Operativa Aplicadas y Calidad, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España

INTRODUCTION

Even though HOS-test has been commonly used to evaluate sperm viability and it allows the use of semen sample in the following ICSI cycle, it has several disadvantages as the time required, the complexity, and the risk of false positives results due to the spontaneously developed tails swelling (SDTS). On the other hand, it is assumed that motile spermatozoa are viable, so TM could predict the percentage of viable spermatozoa. In this sense, TM evaluated automatically also allows the use of the semen samples in the following FIV/ICSI cycle. Furthermore, TM is simpler, less time-consuming and more cost-effective.

OBJECTIVES

The aim of this study is to compare the sperm viability assessed by HOS-test with TM to purpose a more simple way to evaluate viability.

MATERIAL AND METHODS

Prospective study in which a total of 106 semen samples were included, 53 were fresh samples and 53 were prepared samples by swim-up. Total motility (TM), progressive motility (PM) and no progressive motility (NPM) using computer-assisted analyser and HOS-test were performed in each sample. An aliquot of semen sample (100 microliters) was mixed with tempered HOS solution. After incubation time, 200 spermatozoa were counted, obtaining the percentage of viable spermatozoa was obtained. TM, PM and NPM were assessed using CASA system (Computer-Assisted Sperm Analysis). Multivariate linear regressions were performed. R2 and residual mean squares (RMS) were used as accuracy indicators in order to compare models. Moreover a comparison of RMS of the models was made using F-test. P

RESULTS

PM, TM and percentage of viable spermatozoa after HOS-test (HOS) results comprised a wide range of values. Maximum and minimum values obtained for these variables are the following: PM (0% to 99.30%), TM (1.50% to 99.30%), HOS (1.10% to 98%). Two linear regression models obtained, considering as explanatory variables PM and TM respectively, could predict viability results obtained by HOS-test (HOS = 8.56+0.93·PM, R2=95.79%; HOS-test = 1.38+0.97·MT R2=99.10%). Here, sample origin (fresh or prepared by swim-up) showed no effect. It was found that differences of RMS between models considering PM and TM (44.32 vs 9.51) were not random according to the results showed by de F-test (P2=29.31%), it partly contributed to explain viability results demonstrating that no-progressive spermatozoa are also viable. In addition, this model also included the sample origin (prepared or no-prepared) showing better accuracy in non-prepared samples than in those prepared (R2=8.23% vs R2=1.38%) possibly due to the minimal no-progressive spermatozoa presented in the sample after the swim-up.

CONCLUSIONS

Relationship between TM and HOS-test viability results has been established. Sperm viability determination applying the model obtained considering TM could become a less time-consuming and more cost-effective method than HOS-test. Furthermore, it is a more objective technique because CASA system is used to evaluate TM. Furthermore, TM minimizes the false positive risk associated to SDTS. Moreover, the model obtained could be used to predict sperm viability in both, fresh and prepared samples by swim-up. Also, the model is valid for both, normozoospermic or asthenozoospermic patients.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-093: EFECTO DE LA DELECIÓN DEL GEN DE LA STANNIOCALCIN-2 SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA EN RATONES

N. Hernández Rollán (1), L. González Fernández (2), C. Tobajas Vega (1), E. Matilla Pinto (1), P.C. Redondo Liberal (3), J.A. Rosado Dionisio (3), J. Mijares Gordún (1), F.M. Sánchez Margallo (1), I.S. Álvarez Miguel (1), B. Mácias García (1)
(1) Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, Cáceres, (2) Grupo de Señalización Intracelular y Tecnología de la Reproducción (SINTREP), Universidad de Extremadura. Cáceres., (3) Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura. Cáceres

INTRODUCCIÓN

La stanniocalcin (STC) es una glicoproteína crucial para el mantenimiento de la homeostasis del calcio en mamíferos. La stanniocalcin presenta dos isoformas STC1 y STC2, con funciones que son poco exploradas en reproducción asistida, pero algunas investigaciones preliminares indican que las STC podrían emplearse como marcadores de fertilidad y fecundación, así como de resistencia del óvulo al estrés. Hemos observado que en los cruzamientos, los ratones knockout para STC2 (STC2(-/-)) tienen camadas más reducidas que la cepa B6D2F1 no modificada (3.4 ± 0.4 vs. 6.4 ± 0.7; media ratones/camada ± EEM, n = 10).

OBJETIVO

Determinar si la disminución en la fertilidad observada se asocia a una peor calidad espermática de ratones STC2(-/-).

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron ratones machos de entre 8 y 12 semanas de la cepa B6D2F1 (B6D2, n = 4) y ratones de la cepa C57BL/6J STC 2(-/-) (n = 4). Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se extrajeron los epidídimos. Una vez obtenido el semen, los espermatozoides se incubaron en medio HTF durante 45 minutos a 37ºC en una atmósfera de 5% CO2/95% de aire para inducir al capacitación. Después se procedió al análisis de la motilidad espermática usando un sistema de análisis computerizado (CASA, Proiser, Valencia). Además, se determinó la viabilidad espermática y el incremento en el desorden lipídico de la membrana plasmática asociado a la capacitación mediante citometría de flujo, empleando las sondas ioduro de propido (IP) y merociania-540/YoPro-1.

RESULTADOS

Para el análisis de los datos se utilizó un test t-student para comparar los grupos considerándose estadísticamente significativo un valor de $p<0.05$. Los valores de motilidad total y progresiva fueron 31.7 ± 6.8% y 23 ± 5.4%, respectivamente para la cepa B6D2 y 35 ± 2.8% y 23.7 ± 2.7 % para los STC2(-/-). Tras el período de capacitación, la viabilidad espermática fue del 51.8 ± 6.7% para B6D2 y 51.2 ± 1.6% para STC2(-/-); en el caso de los espermatozoides vivos que mostraron cambios en la desorganización lipídica de la membrana asociados con la capacitación se encontraron un 43.4 ± 6.1% de espermatozoides positivos a la tinción con merocianina-540 para la cepa B6D2 y un 41.8 ± 3.2% para STC2(-/-), respectivamente (media ± EEM; $p > 0.05$).

CONCLUSIONES

La disminución en la prolificidad observada en los ratones STC2(-/-) no parece deberse a un factor masculino asociado a una peor calidad espermática. Deben hacerse más estudios en hembras para determinar si la ausencia de stanniocalcin-2 afecta negativamente a la fertilidad femenina o si la disminución en la prolificidad de esta cepa se debe al proceso de transgénesis necesario para producir cepas knockout.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-094: EFECTO DE LA TEMPERATURA AMBIENTAL SOBRE LA CALIDAD SEMINAL TENIENDO EN CUENTA DIFERENTES CONTAMINANTES DEL AIRE

R. Lafuente Varea (1), K. Lattes (1), M. González Comadran (2), M. Brassesco Macazzaga (1), M. Cirach Pradas (3), D. Martínez Murciano (3), M. Nieuwenhuijsen (3), M.A. Checa Vizcaíno (2), B. Jacquemin (3)
(1) CIRH. EUGIN. Barcelona, (2) Hospital del Mar. Barcelona, (3) ISGlobal. Parc Salut Mar. Barcelona

INTRODUCCIÓN

Algunos estudios sugieren que los valores medios de concentración espermática han disminuido hasta un 50% en los últimos 50 años y que en ciudades industrializadas hay un aumento de la infertilidad masculina. Muchos factores ambientales podrían ser la explicación a este problema: la exposición a disruptores endocrinos, a la polución del aire o los hábitos de vida. Pero pocos estudios valoran el efecto de la temperatura ambiental en la calidad del semen. Se sabe que un incremento de temperatura a nivel testicular reduce la calidad seminal pero no está claro cómo afecta la temperatura ambiental a la calidad del esperma, y si la contaminación del aire puede interferir en la asociación entre temperatura y calidad seminal.

OBJETIVO

Evaluar el efecto de la temperatura ambiental sobre la calidad seminal en individuos sanos, y si dicha asociación es independiente de la contaminación atmosférica.

MATERIAL Y MÉTODO

Se incluyeron 172 individuos sanos, sin factor masculino y menores de 30 años (24.6 años ± 4.2), de los que se recogió información sociodemográfica, hábitos de vida y lugar de residencia. Los parámetros seminales se analizaron mediante sistema CASA (ISAS, Proiser) y se consideró: volumen seminal, contaje total de espermatozoides y movilidad progresiva.

La temperatura media, mínima y máxima se estimó para cada muestra de semen en los períodos entre 0-9 días, 10-14 días, 70-90 días y 0-90 días previos a la eyaculación Los contaminantes atmosféricos (NO2, NOx, PM10, PMcoarse, PM2.5 y PM2.5abs) se estimaron para cada una de las direcciones de residencia usando modelos LUR (land use regression) dentro del marco del proyecto europeo ESCAPE. Las diferentes exposiciones se asignaron usando diferentes ventanas de tiempo antes de la eyaculación (0-9 días, 10-14 días, 70-90 días y 0-90 días).

La asociación entre la temperatura y los parámetros seminales se evaluó mediante modelos mixtos para tomar en cuenta la repetitividad y ajustando por edad, tabaco y nivel socio-económico a nivel contextual. En un segundo tiempo se ajustó también por cada uno de los contaminantes.

RESULTADOS

Los 172 participantes contribuyeron con un total de 597 seminogramas. No se observa un efecto estadísticamente significativo de la temperatura sobre el volumen seminal, pero sí se ve un efecto inversamente proporcional al contaje total de espermatozoides para todos los intervalos de tiempo considerados: 0-9 días (RR=0.993 IC95% 0.986 / 1.000; p=0.046), 10-14 días (RR=0.990; IC95% 0.983 / 0.997; p=0.006), 70-90 días (RR=0.990; IC95% 0.983 / 0.998; p=0.010) y 0-90 días (RR=0.987; IC= 0.979 / 0.995; p=0.001).

También se observa una disminución significativa de la movilidad progresiva con el aumento de la temperatura en todos los intervalos de tiempo: 0-9 días (ß= - 0.279; IC95% - 0.510 / - 0.049; p=0.017), 10-14 días (ß= - 0.399; IC95% -0.624 / - 0.174; p=0.001), 70-90 días (ß= - 0.529; IC95% - 0.744 / - 0.314; p=0.000) y 0-90 días (ß= - 0.644; IC95% - 0.894 / - 0.394; p=0.000).

Después de ajustar por los diferentes contaminantes, el efecto de la temperatura sobre la calidad seminal persiste prácticamente en todos los contaminantes analizados y para cada uno de los intervalos de tiempo.

CONCLUSIONES

Este estudio realizado en una población joven y sana muestra un efecto de la temperatura ambiental sobre la concentración y la movilidad espermática, incluso cuando se tiene en cuenta los diferentes contaminantes atmosféricos, la edad, el consumo de tabaco y el nivel socioeconómico. Esta evidencia puede ayudar a entender mejor las causas del descenso de la calidad espermática e identificar factores de riesgo de una disminución de la calidad del semen.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-095: INFLUENCIA DEL TIEMPO DE LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA IN VITRO SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE TIROSINA Y EL ESTADO ACROSOMAL

L. Robles Gómez (1), A. López Botella (1), E. Pérez Rico (1), P. Sáez Espinosa (1), N. Huerta Retamal (1), J. Aizpurua (2), A. Romero (1), M.J. Gómez Torres (3)
(1) Departamento Biotecnología, Universidad de Alicante (España), (2) IVF Spain, Reproductive Medicine (Alicante, España), (3) Cátedra Human Fertility, Universidad de Alicante (España)

INTRODUCCIÓN

La fosforilación de tirosina en el flagelo del espermatozoide es un biomarcador de elevada importancia debido a su implicación en la hiperactivación durante la capacitación y a su vinculación con la capacidad fecundante1. A su vez, el estado acrosomal se ve modificado durante el proceso de fecundación siendo imprescindible la liberación del contenido acrosomal para el paso a través de la zona pelúcida2. Sin embargo, poco se conoce sobre la relación entre el estado acrosomal y la presencia de tirosina fosforilada en diferentes condiciones fisiológicas en el espermatozoide humano.

OBJETIVO

Evaluar el estado acrosomal de espermatozoides humanos en función de la presencia o ausencia de tirosina fosforilada en el área flagelar tras la capacitación (1h y 4h) y la posterior inducción de la reacción acrosómica.

MATERIAL Y MÉTODO

Las muestras se obtuvieron de donantes normozoospérmicos. La capacitación se llevó a cabo mediante swim-up (1h y 4h) y la inducción de la reacción acrosómica mediante ionóforo de calcio A23187. La fosforilación de tirosina se observó por inmunofluorescencia usando el anticuerpo anti-fosfotirosina (PY20) y un anticuerpo secundario conjugado con Cy3 y el estado acrosomal mediante la lectina Pisum sativum agglutinin (PSA) conjugada con FITC. Aquellos espermatozoides que mostraron fluorescencia en la región acrosomal se consideraron no reaccionados (P1), mientras que los que la mostraban en el segmento ecuatorial se consideraron reaccionados (P2) (Figura 1). Se observaron un mínimo de 100 células por muestra utilizando microscopía confocal y los datos se analizaron mediante la distribución t de Student ($p<0,05$).

RESULTADOS

En cuanto al estado acrosomal de los espermatozoides antes y después de la capacitación durante 1h y 4h no se encontraron diferencias significativas en relación a la presencia de tirosina fosforilada, siendo el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma íntegro alrededor de un 80% en todas las condiciones fisiológicas (Tabla 1). Este dato sirve de control y coindice con el 20% de reacción acrosómica espontánea descrita en la bibliografía3. Además, se observó que conforme aumenta el tiempo de capacitación se incrementa el porcentaje de espermatozoides con fosforilación de tirosina a nivel del flagelo1.

Tras la inducción de la reacción acrosómica, se comparó el estado acrosomal de los espermatozoides previamente capacitados durante 1h y 4h. Los resultados mostraron que el porcentaje de espermatozoides capaces de llevar a cabo la reacción acrosómica aumentó significativamente entre aquellos espermatozoides capacitados durante 1h y 4h. Este dato concuerda con otros trabajos donde se destaca la necesidad de capacitar durante 4h para que el espermatozoide adquiera la capacidad fecundante4. Además, al utilizar la fosforilación de tirosina como segundo bio-marcador se observó que los espermatozoides que mostraban fosforilación de tirosina en el flagelo presentaron un porcentaje significativamente mayor ($p<0.05$) de reacción acrosómica en comparación con aquellos en los que la fosforilación estaba ausente.

CONCLUSIONES

El estado acrosomal de los espermatozoides tras la inducción de la reacción acrosómica se relaciona con el tiempo de capacitación. Del mismo modo, la presencia de tirosina fosforilada en la región flagelar se relaciona con un mayor porcentaje de espermatozoides capaces de desencadenar la reacción acrosómica. Por consiguiente, nuestros resultados apoyan la hipótesis de aumentar el tiempo de capacitación in vitro y destacan la importancia de la fosforilación de tirosina en el flagelo para llevar a cabo una adecuada exocitosis del contenido acrosomal.

Por lo tanto, el análisis simultáneo de biomarcadores espermáticos, tales como la fosforilación de tirosina y el estado acrosomal, permite definir con precisión los cambios moleculares experimentados por los espermatozoides durante la capacitación y reacción acrosómica, proporcionando una herramienta útil para mejorar los métodos de selección espermática.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sakkas, D., Leppens-Luisier, G., Lucas, H., Chardonnens, D., Campana, A., Franken, D.R. & Urner, F. 2003, Localization of tyrosine phosphorylated proteins in human sperm and relation to capacitation and zona pellucida binding ,Biology of reproduction, 68, no. 4, pp. 1463-1469.

2. Yanagimachi, R. 1994, Mammalian fertilization inThe Physiologist of reproduction, ed. Raven Press, E. Knobil & J.D. Neill, new york, pp. 189-317

3. Sosa, C.M., Pavarotti, M.A., Zanetti, M.N., Zoppino, F.C.M., De Blas, G.A. & Mayorga, L.S. 2015, Kinetics of human sperm acrosomal exocytosis , Molecular human reproduction, 21, no. 3, pp. 244-254

4. Baibakov, B., Boggs, N. A., Yauger, B., Baibakov, G., & Dean, J. (2012). Human sperm bind to the N-terminal domain of ZP2 in humanized zonae pellucidae in transgenic mice.The Journal of Cell Biology, 197(7), 897-905.

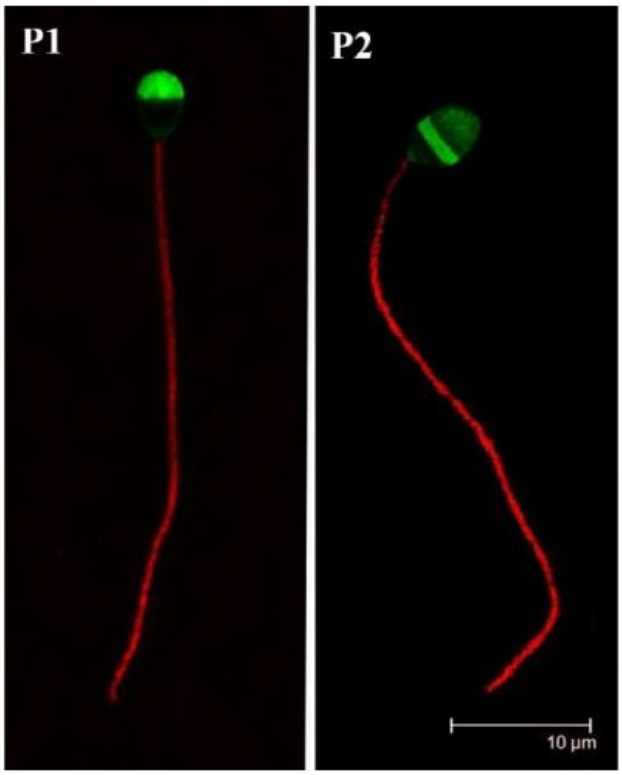


Figura 1: La inmunofluorescencia muestra de forma simultánea la presencia de Pisum sativum agglutinin (PSA) a nivel de la cabeza (verde) y la fosforilación de tirosinas en el flagelo (rojo). P1: no reaccionado; P2: reaccionado

Estadío fisiológico	Tiempo	FT	% P1 ± SD	% P2 ± SD
No capacitado		-	81.98 ± 15.55	18.02± 15.54
		+	75.96± 13.95	24.03 ± 13.95
Capacitado	1h	-	88.10 ±5.00	11.90 ± 5.01
		+	76.99 ± 13.04	23.00 ± 13.04
	4h	-	77.39 ± 2.99	22.61 ± 2.99
		+	77.99 ± 7.02	22.01 ± 7.02
Reaccionado	1h	-	50.39 ± 15.52	49.61 ± 15.51
		+	33.25 ± 21.37	66.75 ± 21.37
	4h	-	24.83 ± 9.47	75.16 ± 9.46
		+	4.41 ± 2.79	95.59 ± 2.79

Tabla 1: Media y desviación estándar del porcentaje de espermatozoides en función del estado acrosomal en diferentes condiciones fisiológicas.
FT: Fosforilación tirosina
SD: Desviación estándar

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-096: SEMEN FRESCO VERSUS SEMEN CONGELADO EN PACIENTES NORMOZOOSPÉRMICOS

C. Selva Viñals, M. Grossmann Camps, A. Rabanal Anglada, C. Guix Galcerán, O. Serra Ortiz, R. Olivares Vela, L. Zamora Corzo
Barcelona IVF, Barcelona

INTRODUCCIÓN

Existen varios estudios que analizan como la congelación y descongelación de muestra seminal puede afectar al espermatozoide y su viabilidad, pero ¿realmente la congelación/descongelación de esta muestra tiene un impacto directo sobre el ciclo de FIV?

Objetivo

El objetivo es determinar si utilizar muestra de semen obtenida en fresco o muestra previamente congelada y descongelada el día de la punción afecta al éxito de un ciclo de FIV; si las tasas de fecundación, embrión evolutivo, embarazo y, al final, niño en casa son afectadas por el tipo de muestra utilizada.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio retrospectivo de 117 casos: se incluyen ciclos de donación de ovocitos (107 casos) y ciclos de ovocitos propios (10 casos) en los que la paciente era menor de 35 años, con análisis hormonal normal y causa de esterilidad iatrogénica. En todos los casos, se descartó el factor masculino como causa de esterilidad y las muestras utilizadas eran normozoospérmicas.

En el Grupo 1 se utilizó muestra de semen fresca (32 casos) y en el Grupo 2 se utilizó muestra congelada previamente y descongelada el día de la inseminación (85 casos). Las muestras fueron preparadas para ICSI mediante gradientes de densidad al 90%, 70% y 50%. Los embriones se cultivaron en medios secuenciales Vitrolife en EmbryoScope hasta D+5/D+6 y hubo transfer de un único blastocisto.

El método estadístico utilizado para comparar las tasas de fecundación, evolución a blastocisto y beta positiva (ß+) entre los grupos fue Chi-Cuadrado (x2) y para la evolución de la gestación se utilizó el test Fisher.

RESULTADOS

En el Grupo 1 se obtuvieron 364 ovocitos, de los cuales 288 eran MII y 227 presentaron 2PN (tasa fecundación: 78,8%). En el Grupo 2 se obtuvieron 1002 ovocitos, de los cuales 787 eran MII y se fecundaron 576 (tasa fecundación: 73,2%). En el Grupo 1, 158 embriones llegaron al estadio de blastocisto (tasa embrión evolutivo: 70%) y en el Grupo 2, llegaron 396 blastocistos (tasa embrión evolutivo: 69%).

La tasa de ß+ en el Grupo 1 fue de 62,5% y en el Grupo 2 de 57,7%. Respecto a la tasa de embarazo evolutivo, en el Grupo 1 se observaron 14 sacos sobre 18 ß+ (77,8%) y hubo 4 abortos bioquímicos (BQ) (22,2%). En el Grupo 2 se observaron 41 sacos (41/46=89,1%) y hubo 5 BQ (10,87%).

No existen diferencias estadísticamente significativas en las tasas de fecundación, embrión evolutivo,ß+ ni embarazo evolutivo entre los grupos.

A la espera de la evolución de 25 gestaciones, se calculó la tasa de niño en casa: en el Grupo 1 fue del 75% (6/8) y en el Grupo 2 del 58,3% (14/24). La tasa de aborto fue del 12,5% (1/8) en el Grupo 1 y de 37,5% (9/24) en el Grupo 2; la tasa de ectópicos fue del 12,5% (1/8) en el Grupo 1 y de 4,17% (1/24) en el Grupo 2. No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

CONCLUSIONES

El hecho que no se encuentre ninguna diferencia en los parámetros analizados, nos permite concluir que tanto las muestras de semen congeladas/descongeladas como las obtenidas en fresco el día de la punción son equiparables y no hay una clara ventaja de utilizar un tipo de muestra frente a otra.

Esto nos permite conseguir flexibilidad para los pacientes en el momento de la obtención de la muestra, facilita la organización del laboratorio en aquellos pacientes que tienen dificultad en la obtención de la muestra y permite realizar estudios adicionales como el test de fragmentación de DNA en las muestras congeladas.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-097: UTILIDAD DE UN SISTEMA CONTROL A TIEMPO REAL PARA MONITORIZAR EL PH DE LOS INCUBADORES PARA CULTIVO EMBRIONARIO Y DETECTAR POSIBLES INCIDENCIAS

G. Arroyo Cardona (1), B. Carrasco Canal (1), Y. Gil Saumell (1), M. J. Gómez Cuesta (1), C. López Grado (2), S. Geelhood (3), A. Veiga Lluch (1), M. Boada Palà (1)
(1) Hospital Universitario Quirón Dexeus, Barcelona, (2) Concile Diagnostics, SL, Badalona, Barcelona, (3) SAFE Sens. Seattle USA

INTRODUCCIÓN

Las modificaciones del pH del medio de cultivo embrionario comprometen su desarrollo. Tradicionalmente, se ajusta el CO2 de los incubadores para conseguir el pH idóneo a través de mediciones puntuales del pH del medio de cultivo equilibrado (Swain, 2015), con periodicidad variable según cada laboratorio. De hecho, se ha demostrado una pérdida de capacidad de regulación del pH intercelular en ovocitos maduros denudados y en embriones descongelados. Se ha reportado que estos cambios que pueden tener consecuencias en la actividad metabólica, la localización de los orgánulos celulares e incluso en el desarrollo fetal.

OBJETIVO

Valorar la utilidad del equipo SAFE Sens TrakStation™ como herramienta para la monitorización a tiempo real del pH de los incubadores y en la detección de incidencias estructurales o de funcionamiento de éstos.

MATERIAL Y MÉTODO

El equipo utilizado es un sistema de monitorización automática de pH no invasivo. Utiliza una cubeta-sensor-fluorescente que contiene 100 µl de medio de cultivo recubierto de 50 µl de aceite mineral. Este sensor se dispone en un lector de fluorescencia de fibra óptica conectado a un TrakPod externo para cada incubador, que toma medidas del pH cada 30 minutos y envía los datos a la TrakStation. Una sola TrakStation puede monitorizar hasta 8 equipos y los datos se almacenan en un USB.

Se ha analizado el efecto de las actuaciones de limpieza y condiciones de mantenimiento en las que se encuentra el equipo en el pH de los medios de cultivo (G-TL y Ovoil, Vitrolife™) de 6 incubadores Heracell® configurados para un cultivo a 37ºC y 6% de CO2.

RESULTADOS

El equipo ha demostrado ser eficiente para la monitorización constante de los valores de pH del medio aunque puede dar valores erróneos si la preparación de la cubeta no es la correcta (falta de aceite, evaporación del medio etc.) Fig 1A. En general se ha observado que se requiere un mínimo de 24h para equilibrar el medio de cultivo de la cubeta por lo que los resultados iniciales no deben ser considerados despreciarse. Esto se debe tener en cuenta cada vez que se cambian las cubetas semanalmente. Fig 1B Lo mismo ocurre cuando se varían las condiciones de temperatura y humedad por suspensión temporal del incubador para su limpieza, durante su reinicio. Fig 1C. El sistema ha resultado ser efectivo para poner de manifiesto alteraciones estructurales o de mantenimiento de un equipo como por ejemplo un cierre no hermético de la puerta que requiera una acción de mantenimiento inmediata. Fig1D.

CONCLUSIONES

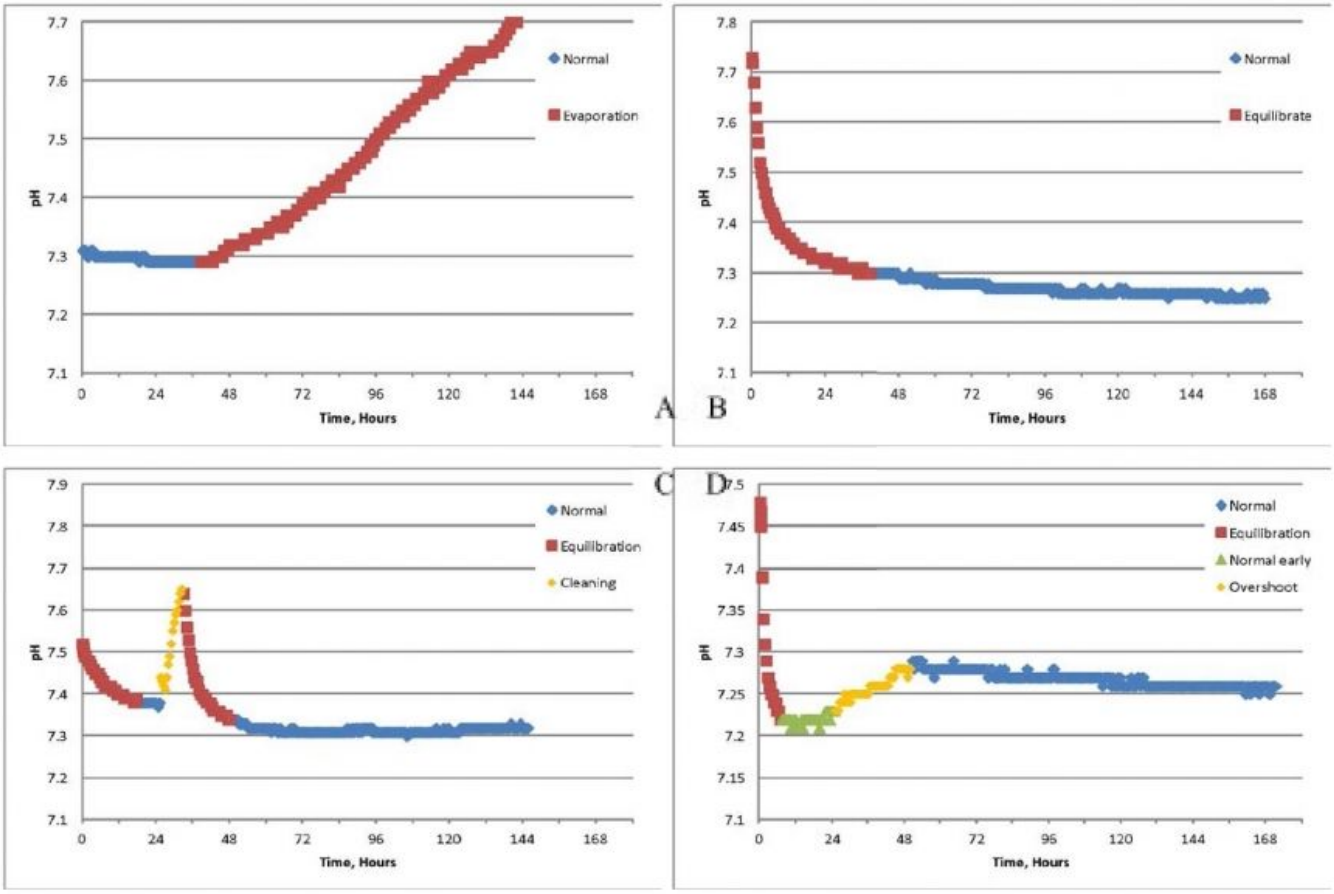
La monitorización continua del pH en el cultivo de los embriones permite el control constante del pH en todo momento.

El equipo SAFE Sens TrakStation permite visualizar gráficamente alteraciones del pH como consecuencia de diferentes incidencias durante el cultivo embrionario por lo que su empleo puede ser de gran utilidad en los laboratorios de TRA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Swain JE. Optimal Human Embryo Culture. Semin Reprod Med 2015; 33:103–117.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2



Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-098: TERMOGRAFÍA APLICADA AL LABORATORIO DE CRIOBIOLOGÍA

E. Huguet Gutiérrez, J. Fernández Sanz, M.J. Molina Mora, D. Cernuda Hernández, A. Martínez Fernández
IVI MADRID, Madrid

INTRODUCCIÓN

La termografía es una técnica que permite, a través de la medición de la radiación infrarroja que emiten los objetos, obtener una medida de temperatura (Tª) superficial del mismo. El instrumento que se usa para medir es la cámara de infrarrojos cuya principal ventaja es que es una técnica de medida sin contacto, por lo que no afecta a las condiciones de los objetos observados.

Como ya se demostró en el año 1884 (Josef Stefan y Ludwig Boltzmann) existe una correlación entre la Tª de un objeto y la intensidad de la radiación infrarroja que emite. Una cámara termográfica mide la radiación infrarroja de onda larga en su campo de visión y calcula a partir de esta la Tª del objeto. El cálculo tiene en cuenta la emisividad ( ) de la superficie del objeto medido, así como la compensación de la Tª reflejada (RTC). La emisividad es una propiedad de la superficie del objeto, existiendo materiales que conducen bien la electricidad y otros no.

OBJETIVO

Medir la Tª de las superficies de trabajo mediante termografía donde se realizan los procedimientos de vitrificación y desvitrificación de oocitos/embriones.

MATERIAL Y MÉTODO

Para la medición termográfica se usó una cámara térmica FLIR ONE incorporada en un móvil CATS60. Una sonda de Tª 2110T WaterProof (RI®) para líquidos. Se usaron 2 tipos de warming plates: circulares y dobles; placas de Petri de 35 mm Ø; una superficie calefactada de 60x40 cm; termobloques para los tubos de TS (Thawing Solution, Kitazato®). Topes de silicona adhesivos.

Se tomaron termografías de las superficies de los materiales descritos. En el caso de los termobloques nos ayudamos de la sonda de Tª para líquidos para ajustar la Tª de la solución TS a 37ºC. Además, se pusieron unos pequeños topes adhesivos de silicona en las warming plates para evitar el contacto directo del aluminio con el acero de la superficie de las cabinas de flujo, que suele estar a Tª ambiente.

Las medidas se hicieron al minuto 0, es decir, una vez que se trasladaron de la placa calefactada y se pusieron sobre la superficie de la cabina de flujo; y una vez transcurrido el primer minuto. Se compararon el mismo tipo de warming plates con y sin topes de silicona, ambos tipos de warming plates con topes de silicona. También se midieron las warming plates circulares con una placa de Petri, simulando el transporte de embriones a la cabina, con topes de silicona, sin ellos y sin la warming plate, al min 0 y tras el primer minuto.

Por cada material se han realizado al menos 3 medidas.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se presentan como la media de las 3 medidas realizadas en la siguiente tabla, todas ellas expresadas en ºC.

	Tª 0 min	Tª 1 min	Tª0 – Tª1
	33,7	24,5	9,2
	32,8	21,4	11,4
	35,1	33,3	1,8
	33,8	29,8	4,0
	32,8	30,6	2,2
	33,4	32,4	1,0
	30,5	29,6	0,9
	30,2	25,9	4,3
	29,3	22	7,3

Warming plate Circular con topes de silicona
Warming plate Circular
Placa de Petri de 35 mm ∅
Warming plate Doble
Warming plate Doble con topes de silicona

CONCLUSIONES

La termografía ha permitido de una manera rápida y sin contacto alguno con muestras biológicas determinar qué materiales mantienen mejor la Tª y de qué manera se pierde menos Tª, lo que nos ha ayudado a tomar decisiones respecto a dónde posicionar el material para que los procedimientos sean más efectivos en el laboratorio de Criobiología.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-099: TRANSFERENCIA DE EMBRIÓN ÚNICO EN UNA UNIDAD PÚBLICA DE REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA

L. Sánchez Castro (1), V. Castañón Bernardo (1), C. Barneo Caragol (1), M. Naves Díaz (1), V. Jiménez Moreno (2), E. Fernández Fernández (1), M. Méndez López (1), C. González González (1), P. Antuña González (1), P. Llaneza Coto (1)
(1) (HUCA) Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Principado de Asturias, (2) Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander

INTRODUCCIÓN

Desde hace años se sabe que uno de los mayores riesgos de las Técnicas de Reproducción Humana Asistida son los embarazos múltiples. El factor más importante asociado con los embarazos múltiples es el nº de embriones transferidos. Para reducir, en la medida de lo posible, la tasa de embarazos gemelares sin que se afecte la tasa de embarazo global se han puesto en marcha protocolos que seleccionan pacientes que se beneficiarían de la transferencia de un solo embrión sin que se vea mermada su posibilidad de gestación.

OBJETIVO

Reducir la tasa de embarazo gemelar en un grupo seleccionado de pacientes.

MATERIAL Y MÉTODO

GRUPO SET: Pacientes con 35 años o menos en primeros ciclos de fecundación in vitro y con al menos 2 embriones sobrantes para congelar y que transfieren 1 embrión.

GRUPO DET: Pacientes con 35 años o menos en primeros ciclos de fecundación in vitro y con al menos 2 embriones sobrantes para congelar y que transfieren 2 embriones.

El cultivo se hizo con medios secuenciales y la transferencia se realizó en el día +2 o +3. Los embriones sobrantes de buena calidad se vitrificaron en un sistema cerrado.

Las pacientes se citaron 5-6 semanas después de la transferencia, para control de embarazo, documentándose sólo aquellas gestaciones en las que se aprecia saco gestacional.

RESULTADOS

No se observan diferencias significativas cuando se comparan las tasas de embarazo entre ambos grupos y no hubo gestaciones gemelares en el grupo de SET, frente a una tasa de un 18% en el grupo DET. La tasa de aborto fue del 15% en ambos grupos.

Cuando se analizaron las tasas de embarazo acumuladas (transferencias en fresco + transferencia de embriones acumulados), tampoco se observan diferencias significativas entre ambos grupos, aunque si hay una tendencia hacia más tasa de gestación clínica en el grupo DET. También se observa una mayor tasa de aborto acumulada en el grupo DET, pero no hay diferencias significativas.

CONCLUSIONES

1. En un grupo seleccionado de pacientes, el número de embriones transferidos no afecta a la probabilidad de conseguir embarazo.

2. Dentro del grupo seleccionado, las pacientes que transfieren dos embriones tienen más tasa acumulada de embarazo pero también más tasa acumulada de aborto. Las diferencias no son significativas cuando se comparan con el grupo que transfiere un embrión.

3. Seleccionando las pacientes se puede establecer un programa de transferencia de embrión único, sin cultivo a blastocisto, sin que las tasas de gestación global se vean afectadas.

BIBLIOGRAFÍA

Christina Bergh. "Single embryo transfer: a mini-review". Human Reproduction Vol.20, No.2 pp. 323–327, 2005

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-100: GV RESCUE APPROACH FOR LOW MII-OOCYTE RESPONDERS

L. Escrich Albelda, N. Grau Grau, N. Soler Balaguer, A. Galán Rivas, S. Pérez Albalá, T. Viloria Samochín, P. Gámiz Izquierdo, C. Albert Rodríguez, M.J. de los Santos Molina, M.J. Escribá Pérez
IVI-Valencia, Valencia

INTRODUCTION

Following a controlled ovarian hyperstimulation (COS), nearly 15% of the retrieved oocytes were immature and usually discarded of the IVF cycle. However, in some patients, this percentage of immature oocytes could be increased and therefore, the number of MII could be reduced which might compromise the pregnancy chance. Thus, in this work we present our preliminary clinical results on rescuing GV oocytes by spontaneously in vitro maturation.

GV oocytes, retrieved from stimulated cycles do spontaneously progress to the MII stage and were able to give rise to babies born.

OBJECTIVES

To assess the in vitro and in vivo outcome of immature GV oocytes recovered from women with low MII-oocyte response.

MATERIAL AND METHODS

Patients with or without medical indication for pre-implantational genetic screening for aneuploidies, from whom GV ≥4 and MII≤6 at retrieval, were included in this study. GV oocytes were overnight cultured in a time-lapse incubator in order to select within the IVM-MII those that had matured within the first 23.4h of culture. In early maturing oocytes and in in vivo-matured oocytes (MII at retrieval), the ICSI and subsequent in vitro culture up to the blastocyst stage were performed, in order to obtain blastocysts to be transferred, cryopreserved or genetic screening.

As to in vitro outcomes, we assessed, according to the oocyte origin (in vivo- and in vitro-matured): the in vitro maturation (IVM), fertilization and blastocyst rates. When appropriated, the biopsy and euploid rates, calculated per biopsied or fertilized egg were also provided and compared between both oocyte origins. The cancellation rate and the direct or long-term benefit of the GV approach given by the number of extra blastocysts added to the IVF cycle due to the GV rescue approach were also described.

RESULTS

A total of 18 patients with medical indication for blastocyst transfer, in association to the PGS-program (n=10) or not (n=8), were included in this study. Table shows the characteristics of the patients and the in vitro outcome, according to patients' indication and oocyte origins.

In general, 44% of retrieved oocytes were at the GV stage and, after overnight culture, 51% matured. In both groups of patients, nearly 2.5 extra MII oocytes per patient were added to the cycle. Within every patient group, comparable fertilization (PGS: 62.3% and non-PGS: 61.8%) and blastocyst (PGS: 45.3% and non-PGS: 52.9%) rates were observed between in vitro- and in vivo-matured oocytes. In the PGS group, the percentage of euploid blastocysts per zygote was comparable between both oocyte origins (average: 22.6%).

In PGS patients, 30% cancellation rate (CR: 3 out of 10 patients) was observed since no matured retrieved oocytes or embryos were available. However, in one of these three patients, the cycle was rescue by the GV approach. In consequence, the CR decreases from 30% to 20%. Besides this immediate benefit, in two patients (20%), a long-term extra benefit due to the GV approach was added to the cycle, since extra blastocysts were obtained.

In non-PGS patients, the CR was 25% (2 out of 8 patients). However, the cycle was rescued in one patient due to the GV approach, and therefore, the CR was reduced to 12.5%. Moreover, in other three patients (37.5% patients), extra blastocysts to be added to the cycle were obtained by the GV approach.

CONCLUSIONS

MII oocytes, obtained by the GV rescue approach were as competent as sibling in vivo-matured oocytes in terms of in vitro outcome. The GV-rescue approach could provide an immediate advantage to the patients by reducing the cancellation rate and, a long-term extra benefit could also be got as it could provide extra blastocysts for subsequent embryo transfers.

	PGS patients (n=10)		Non PGS patients (n=8)	
	In vivo-matured	In vitro -matured	In vivo-matured	In vitro-matured
Age (years-old)	38.2± 2.1 (34-41)		34.6±3.2 (27-37)	
Total oocytes	129 (12.6± 6.7)		98 (10.9± 5.9)	
GV (n, % retrieved oocytes)		57 (44.2)		43 (43.9)
mean number per patient		5.7+1.2		4.8+0.8
MII (%, IVM rate)	57	28 (49.1)	32	23 (53.5)
mean number per patient	5.7± 1.1	2.8± 1.2	3.6± 0.7	2.6± 0.6
Zygotes (n, %)	38 (66.7)	15 (53.3)	19 (59.4)	15 (65.2)
Blastocysts (n, %)	16 (42.0)	8 (53.3)	12 (63.1)	6 (40.0)
Biopied blastocysts (n, %)	15 (39.5)	3 (20.0)		
Euploid blastocysts (% euploid per biopsied)	9 (60.0)	3 (100.0)		
(%, euploid per fertilized)	(23.7)	(20.0)		

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-101: ADHERENCIA DEL ESPERMATOZOIDE A LA ZONA PELÚCIDA SEGÚN ESTADIO MADURATIVO TRAS MIV

M. de la Orden Rodríguez (1), T. Laguna Rodríguez (1), I. Peinado Casas (1), P. Torres Gómez (1), P. Polo Sánchez (1), M.J. Gómez Torres (2)
(1) H.U. Politécnico La Fe, Valencia, (2) Departamenteo Biotecnología, Universidad Alicante, Alicante

INTRODUCCIÓN

El test de hemizona (HZA) fue desarrollado como herramienta de diagnóstico con el objetivo de testar in vitro la capacidad fecundante del espermatozoide humano. Es de gran importancia destacar la interacción entre el espermatozoide y la zona pelúcida (ZP) del ovocito, otorgándole a ésta última un papel protagonista en múltiples estudios de infertilidad de origen desconocido. En esta matriz extracelular y glicoproteica se produce un reconocimiento primario que implica la participación de proteínas de la membrana plasmática del espermatozoide; además de un reconocimiento secundario en el que intervienen los componentes de la matriz y membrana acrosomal interna del espermatozoide que ya ha sufrido la reacción acrosómica.

OBJETIVO

Constatar si el grado de adherencia del espermatozoide a la zona pelúcida, es una variante dependiente del estado madurativo del ovocito tras maduración in vitro (MIV).

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron 30 ovocitos en estadio de PI de pacientes estimuladas para un ciclo de FIV/ICSI, tras firmar el consentimiento informado. Una vez incubados en microgotas de IVF durante 24 horas en condiciones de 37ºC y 6% de CO, se identificó de nuevo su estado madurativo y se sometieron a una bisección mediante la ayuda de un láser diodo, obteniéndose dos hemizonas funcionalmente equivalentes. Éstas fueron incubadas durante 3 horas con distintas muestras de semen normozoospérmico capacitadas mediante swim up y se procedió a evaluar el número de espermatozoides totales fijados a cada hemizona.

RESULTADOS

Para el análisis estadístico de los datos se llevó a cabo un T-test, no apareciendo diferencias significativas ($P > 0,05$) entre el número de espermatozoides adheridos a la zona pelúcida de ovocitos en metafase II (MII) 36,71± 53,731; metafase I (MI) 28,18± 43,977 y profase I (PI) 33,78± 32,591.

CONCLUSIONES

En contraposición a anteriores estudios realizados, estos resultados, similares a los propuestos por otros autores sugieren que el reconocimiento primario, característico de cada especie, se produce con independencia del estadío madurativo del ovocito. Así pues, para evaluar el potencial fecundante del espermatozoide podríamos utilizar de manera aleatoria ovocitos en distintos estadíos de maduración. Si estos resultados se confirman, una utilidad clínica sería en un mismo ciclo, destinar los ovocitos inmaduros al test de hemizona, como valor predictivo, previo a la realización de una Fecundación in vitro (FIV).

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-102: CULTIVO EMBRIONARIO ININTERRUMPIDO EN MEDIO ÚNICO FRENTE A CULTIVO EMBRIONARIO CONVENCIONAL EN MEDIOS SECUENCIALES: DIFERENCIAS EN LA TASA DE FORMACIÓN DE BLASTOCISTO

A.P. Ortiz Velasco, C.C. Álvarez Santana, J.C. Alberto Bethencourt
CERT - Centro de Endocrinología de la Reproducción de Tenerife, Santa Cruz de Tenerife

INTRODUCCIÓN

Desde los inicios de la Reproducción Humana Asistida y sus primeras técnicas hasta la actualidad, la evolución de los sistemas de incubación así como de los medios de cultivo embrionario ha sido constante a lo largo del tiempo, teniendo como finalidad ulterior conseguir un desarrollo embrionario optimizado y por lo tanto un incremento en el número de embriones de buena calidad aptos para ser transferidos. La composición de los medios de cultivo embrionario ha evolucionado a lo largo del tiempo con una visible tendencia hacia el uso medio único combinado con sistemas de cultivo ininterrumpidos en los últimos años, minimizando todo lo posible el impacto de los procedimientos de reproducción asistida sobre el embrión.

OBJETIVO

Comparar los resultados clínicos del cultivo embrionario ininterrumpido en medio único frente al cultivo embrionario convencional en medios secuenciales a través de la tasa de formación de blastocistos en D+5/D+6

MATERIAL Y MÉTODO

Para la realización de la revisión se analizó el desarrollo en cultivo de un total de 199 embriones provenientes de 24 pacientes que se sometieron a un tratamiento de FIV/ICSI con cultivo largo hasta blastocisto (D+5/D+6) durante el año 2016. Se establecieron dos grupos de estudio: el grupo 1 constituido por 86 embriones cultivados de forma convencional en medios de cultivo secuenciales: G- plus (V5) Vitrolife desde D+1 hasta D+3 seguido de G2-plus (V5) Vitrolife desde D+3 hasta D+5/D+6, y el grupo 2 constituido por 113 embriones cultivados de forma ininterrumpida en medio de cultivo único SAGE 1- Step Origio desde D+1 hasta D+5/D+6. Se analizó en ambos grupos la tasa de formación de blastocisto en D+5/D+6.

RESULTADOS

En el grupo 1, 28 de los 86 embriones estudiados copmpletaron la formación del blastocisto expandido en D+5/D+6, obteniéndose un 32,55% de tasa de formación de blastocisto por embrión. En el grupo 2, 55 de los 113 embriones estudiados completaron la formación de blastocisto expandido en D+5/D+6, obteniéndose un 48,67% de tasas de formación de blastocisto por embrión.

CONCLUSIONES

Los resultados indican que la tasa de formación de blastocisto se ve ligeramente incrementada en el cultivo largo hasta D+5/D+6 en medio único SAGE 1-Step Origio. Sin embargo, aunque el uso de medio de cultivo único ofrece ventajas evidentes tanto en la práctica diaria en el laboratorio de fecundación in vitro como en el desarrollo embrionario, aún no existen evidencias clínicas suficientes para establecer una recomendación sólida tanto del medio único como del medio secuencial en la consecución de un cultivo embrionario optimizado.

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-103: SELECCIÓN ESPERMÁTICA CON MACS Y SU IMPACTO REAL EN LA ELIMINACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN

M. González Martínez (1), J. Gosálvez Berenguer (2), E. Gironés (2), M. Dorado Silva (3), F. Sánchez Martín (1), P. Sánchez Martín (1)
(1) Clínica Ginemed Sevilla, (2) Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, (3) Clínica Ginemed Huelva

INTRODUCCIÓN

Los eyaculados de todas las especies de mamíferos presentan niveles apreciables de fragmentación en su ADN espermático. Si estos son muy elevados (superiores a un 30% en el caso de humanos) el resultado del éxito reproductivo se ve alterado a diferentes niveles (fertilización, implantación, desarrollo embrionario o embarazo clínico). Los MACS (MagneticCellSorting) es un sistema de selección espermática encaminado a eliminar espermatozoides con marcadores de apoptosis. La fosfatidilserina (PS) es un fosfolípido localizado en la membrana interna de la membrana plasmática de las células intactas, que se puede externalizar por diversas causas en células bajo situaciones de estrés, hacia la membrana externa. La Anexina V (AnexV) es una proteína que tiene gran afinidad por la PS y se puede utilizar como marcador de esa externalización. El proceso de MACS supone una estrategia no invasiva que permite separar espermatozoides que tienen exernalizada la PS, marcador de apoptosis, mediante la incubación de los mismos con AnexV conjugada con micro-beads magnetizadas. Al pasarlos por un campo magnético los espermatozoides marcados quedarán retenidos en la columna. Los espermatozoides intactos sin AnexV pasarán libremente por la columna y serán recogidos para ser utilizados en fertilización.

OBJETIVO

Analizar las tasas de reducción efectiva de la fragmentación del ADN espermático en las distintas fracciones de una muestra que se procesa con MACS.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio prospectivo realizado sobre 20 pacientes. Se analizaron las variaciones en los valores de fragmentación del ADN en las subpoblaciones MACS+ (Espermatozoides con marca AnexV) y MACS- (espermatozoides sin marca AnexV) con respecto el grupo control (eyaculado NETO).

La metodología de MACS se basó en el kit MACS (Miltenyi Biotec, Colonia, Alemania) y la fragmentación del ADN se realizó con el kit Halosperm (Halotech, Madrid, España).

RESULTADOS

Se encuentran espermatozoides con ADN no fragmentado en la fracción MACS+ y también espermatozoides con ADN fragmentado en la fracción MACS-. En la muestra total, mientras que el control presenta un nivel medio de daño de un 28%, la fracción MACS+ acumula niveles de daño cercanos al 40%. Estos valores disminuyen hasta un 12% en el caso de la fracción MACS-. Las diferencias observadas entre todas las subpoblaciones fueron estadísticamente significativas (P 0.001). El porcentaje de eliminación de espermatozoides degradados es mucho más efectiva tras MACS.

No todas las muestras presentan la misma reducción en los niveles de daño y en algunas de ellas (20% de los casos) las MACS no fueron eficaces en la reducción de los niveles de fragmentación.

En los casos donde se aprecia una disminución eficaz, los MACS pueden reducir la fragmentación del ADN en aproximadamente un 66% en muestras que presentan valores de fragmentación en NETO superiores a un 20%; si estos valores son inferiores a un 20%, el porcentaje de eficacia baja hasta un 25%.

CONCLUSIONES

La utilización de MACS en los tratamientos de reproducción asistida es un método sencillo para reducir el daño presente en el eyaculado de los pacientes que se ven afectados por niveles elevados de fragmentación del ADN, que podría repercutir en un mayor éxito reproductivo a niveles de fertilización, implantación, desarrollo embrionario y embarazo clínico. Sin embargo, no todos los pacientes se benefician de este efecto general, ni la eliminación del daño presente en la muestra inicial es completa.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-104: ESTUDIO COMPARATIVO DE ALGUNOS COMPONENTES DEL FLUIDO FOLICULAR Y DEL PLASMA SEMINAL I: EQUILIBRIO OXIDATIVO

J. Gosálvez Berenguer (1), M. Dorado Silva (2), M. González Martínez (3), C. Torrado García (2), J. Bartolomé Nebreda (1), P. Sánchez Martín (3)
(1) Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, (2) Ginemed Huelva, (3) Ginemed Sevilla

INTRODUCCIÓN

El fluido folicular (FF) es una secreción natural del tracto reproductor femenino que contiene factores que estimulan la maduración del ovocito participando en la regulación de la meiosis. Por otra parte, el espermatozoide, en el momento del eyaculado, está inmerso en el plasma seminal (PS) y este presenta características propias de protección y activación de estos. Los espermatozoides, tras atravesar el cérvix, se encuentra con el FF y estos se integran de forma secuencial en un proceso de selección en el que tan sólo uno de ellos fertilizará el ovulo maduro. En esta etapa, los espermatozoides sufren cambios bioquímicos y funcionales y se hiper-activan hasta interaccionar con la zona pelúcida.

OBJETIVO

Estudio comparativo de la Capacidad Antioxidante Total (TAC) y los de los niveles de ión-superóxido (SOX) presentes en el FF y en el PS.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio prospectivo observacional realizado en 10 varones y en 10 FF en los que se analizan los niveles de SOX y TAC tanto FF y en PS.

El FF se obtuvo del primer folículo seleccionado sin criterio de inclusión por tipo de paciente. Los FF centrifugados a 350g durante 10min, se inactivaron a 56ºC durante 30min. El análisis del estrés oxidativo ligado a la presencia SOX se realizó utilizando el kit Oxi-Sperm (Halotech DNA, Madrid, España). La TAC se analizó utilizando el kit TAC-Sperm (Halotech DNA, Madrid, España). Ambas son dos reacciones colorimétricas y los niveles de color se analizaron con análisis de imagen para la determinación de los valores asociados a SOX y TAC. Se empleó el programa free share ImageJ; https://imagej.nih.gov/ij/index.html sobre imágenes .tif directamente digitalizadas de las reacciones originales utilizando un scanner Xerox-DocuMate-5540. Los valores de intensidad media asociados al color desarrollados tras la reacción se expresan en unidades arbitrarias asociadas a niveles de grises que varían entre los valores 0 (negro) y 255 (blanco).

Valores de SOX cercanos a 225 (control) indican niveles bajos de super-oxido, mientras en el caso de TAC, valores cercanos a 66 (control) indican baja capacidad antioxidante total.

RESULTADOS

Los resultados de SOX y TAC, que se obtuvieron en PS y FF, así como el Ratio entre la presencia relativa de SOX y TAC (SOX/TAC) se muestran en la Tabla 1.

En general, el PS muestra más actividad SOX que la detectada FF y la variabilidad presente entre individuos en también mayor. Por el contrario, el caso del FF, la TAC es elevada y presenta poca variabilidad entre distintos FFs. Los FFs presentan unos niveles de SOX relativamente bajos y poco variable entre individuos. Los Ratios SOX/TAC presentes en FF (R=2,2) y en PS (R=1,2) muestran diferencias estadísticas significativas (P 0.001). Los niveles de SOX y TAC muestran una tendencia a correlacionar negativamente en el caso del PS. Se necesita la inclusión de más datos para corroborar esta tendencia.

CONCLUSIONES

El PS de los varones muestra niveles variables de SOX entre distintos individuos y la presencia de SOX parece estar compensada por una mayor producción de TAC. Sin embargo, en el caso de los FFs la cantidad relativa TAC es superior a la presencia de SOX. La variabilidad observada de los niveles de SOX y TAC en varones podría indicar su relación con la capacidad de fertilización de cada individuo, lo que debe comprobarse en estudios posteriores.

BIBLIOGRAFÍA

Archivo adjunto

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-105: INFLUENCIA DEL TIPO DE CULTIVO IN VITRO SOBRE EL NÚMERO DE EMBRIONES SUBÓPTIMOS QUE ALCANZAN EL ESTADIO DE BLASTOCISTO Y SU CALIDAD EMBRIONARIA

A. Martí Alemany, I. Iniesta Mirón, P.J. Fernández Colom
Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia

INTRODUCCIÓN

Cuando se realizan transferencias embrionarias en D+3, los embriones que no poseen la calidad suficiente para ser transferidos o vitrificados (embriones subóptimos) generalmente se mantienen en un cultivo prolongado hasta D+5/D+6 para observar si consiguen alcanzar el estadio de blastocisto y adquirir la calidad apropiada para ser vitrificados. La optimización de este cultivo resulta ser clave para conseguir un mayor número de gestaciones por punción.

La aplicación de los nuevos medios de cultivo único frente a los cultivos secuenciales, permiten reducir la manipulación a la que es sometida el embrión y el tiempo que permanece fuera del incubador, lo que podría suponer una mejora en el cultivo hasta blastocisto.

OBJETIVO

Establecer si la utilización de un medio único para el cultivo in vitro embrionario, afecta al número de embriones subóptimos que llegan al estadio de blastocisto y a su calidad embrionaria, frente a la utilización de medios secuenciales.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio retrospectivo y comparativo de dos tipos de medios de cultivo. Grupo I: Medio único (Origio SAGE 1-StepTM with human albumin. Ref. 67010060A), n = 527 embriones (pertenecientes a 120 punciones) utilizado desde la fecundación hasta D+6. Grupo II: Medio secuencial (medio G1 Vitrolife desde la fecundación hasta D+3 y medio CCM Vitrolife de D+3 hasta D+6), n = 698 embriones (pertenecientes a 180 punciones foliculares) entre febrero y octubre del año 2015.

Por un lado, se analizó el porcentaje de aquellos embriones que no tenían calidad para ser transferidos o vitrificados en D+3 que alcanzaron el estadio de blastocisto. Por otro lado, se analizó la calidad de esos blastocistos en D+5/+6.

La evaluación de la calidad embrionaria de los embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto se realizó según los parámetros establecidos por ASEBIR. Los embriones fueron cultivados en incubadores convencionales (Heracell, Thermo Fisher Scientific) a 37ºC y 6% de CO2 en ambos grupos.

RESULTADOS

El porcentaje de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto en D+5 fue del 41,9% para el grupo I y del 43,5% para el grupo II (P>0,05). Para D+6, los resultados fueron de un 46% y 44,6% para el grupo I y grupo II respectivamente (P>0,05).

El porcentaje de blastocistos que se vitrificaron en D+5 (calidad A, B o C según la clasificación de ASEBIR) fue del 20,6% para el grupo I y del 27,3% para el grupo II (P>0,05). Por otra parte, para D+6 los resultados para el grupo I y grupo II fueron del 12,4% y 15,6% respectivamente (P>0,05).

Las características de las pacientes incluidas en el estudio (edad media, Índice de Masa Corporal, niveles de estradiol, nº de folículos puncionados, nº total de ovocitos recuperados, nº total de ovocitos MII, nº medio de embriones dejados en cultivo en D+3 por punción) fueron similares para ambos grupos.

CONCLUSIONES

Debido a que los resultados obtenidos con la aplicación de ambos tipos de medios de cultivo no muestran diferencias significativas tanto en llegada a blastocisto como en porcentaje de blastocistos de buena calidad, resulta ser más apropiado el empleo de un cultivo en medio único, ya que conlleva una menor manipulación embrionaria y supone un menor coste al tener que utilizar solamente un medio de cultivo durante todo el proceso de desarrollo embrionario.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-106: ¿POR QUÉ SEGUIMOS TRANSFIRIENDO DOS EMBRIONES?

M. Lierta Sancho, L. Del Molino Álvarez, J.L. Gámez Prieto, C. De Bonrostro Torralba, I. Giménez Blasco, J. Marqués Galán, A. Urries López
Quirónsalud Zaragoza

INTRODUCCIÓN

Pese a las recomendaciones de las sociedades científicas seguimos transfiriendo más de un embrión por transferencia. Todos sabemos que existe mayor probabilidad de conseguir gestación transfiriendo más de un solo embrión, pero hay suficiente evidencia clínica para considerar la Single Embryo Transfer (SET) una opción para reducir la incidencia de embarazo múltiple (especialmente en casos seleccionados) sin comprometer la tasa de gestación. La ESHRE consideran unos resultados óptimos en ciclo de FIV una tasa de embarazo alrededor de un 30% y una tasa de embarazo gemelar inferior al 10%.

Para ello debemos de ser capaces de mejorar la selección embrionaria, con la incorporación de los sistemas time-lapse a la rutina habitual de los laboratorios no solo conseguimos una incubación más estable sino que además nos permite seleccionar aquellos embriones con alto poder de implantación de una forma objetiva.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio es valorar los criterios para realizar la SET, para ello analizaremos los resultados de los embriones seleccionados mediante nuestro sistema time-lapse.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio retrospectivo en el que se analizan 285 ciclos de pacientes que se sometieron a un ciclo de FIV (ovocitos propios y ovocitos de donante) + sistema de time-lapse, se incluyen los ciclo en los que se obtuvieron 4 ó más embriones y se transfirieron 1 ó 2 embriones/transferencia seleccionados con nuestro sistema time-lapse, la edad media es de 36,08 ± 13,44 años en ovocitos propios y de 26,63 ± 0,71 años en ovocitos de donante. Se compara la tasa de embarazo, aborto y embarazo múltiple en función de la edad, la calidad y el número de embriones a transferir.

El sistema time-lapse utilizado para realizar la selección embrionaria fue el TEST EEVA (Early Embryo Viabilty Assesement Test), que ofrece una categorización objetiva y automatizada de los embriones observados, siendo capaz de clasificar los embriones de alto poder de implantación (HIGH).

RESULTADOS

Comparamos la tasa de embarazo, aborto y embarazo múltiple en transferencias de un embrión en función de la edad de la paciente y la calidad del embrión transferido. (Tabla 1)

Comparamos la tasa de embarazo, aborto y embarazo múltiple en transferencias de dos embriones en función de la edad de la paciente y la calidad de los embriones transferidos.

TE:1			EMBARAZO		ABORTO		EMB MULTIPLE	
			nº	%	nº	%	nº	%
1 HIGH n= 28	OVO. PROPIOS	≤ 37años (n=11)	7	63,64%[a]	1	14,29%	0	0,00%
		> 37 años (n=9)	4	44,45%[abcde]	1	25,00%	0	0,00%
	OVO.DONANTE	≤ 35 años (n=8)	5	62,50%	1	20,00%	0	0,00%
1 NO HIGH n=10	OVO. PROPIOS	≤ 37años (n=6)	4	66,67%	1	16,67%	0	0,00%
		> 37 años (n=3)	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
	OVO.DONANTE	≤ 35 años (n=1)	1	100,00%	0	0,00%	0	0,00%

TABLA 1. Porcentaje de embarazo, aborto y embarazo múltiple en transferencias de un embrión en función de la edad y la calidad del embrión transferido. p<0,05

(Tabla 2)

CONCLUSIONES

Disponer de información objetiva del desarrollo embrionario (sistemas time-lapse) permite una mejor selección de embriones a transferir y conseguir así mejores tasas de implantación por embrión transferido, lo que favorece que se realicen más SET sin comprometer la tasa de gestación y eliminando así el riesgo de embarazo múltiple.

La decisión del número de embriones a transferir tiene que ser individual en cada caso, dependiendo de la calidad embrionaria, edad de la paciente, hijos previos...

En mujeres de menos de 38 al no hallar diferencias estadísticamente significativas en la tasa de embarazo cuando se transfieren 1 HIGH vs transferencia de 2 embriones de cualquier categoría (63,64% vs 73,13%; 62,08%; 48,72%) podemos aconsejar la transferia de 1 HIGH y así reducir la tasa de embarazo múltiple en estas pacientes (0% vs 32,56%).

Lo mismo ocurre en la ovodonación, ya que la edad media de los ovocitos donados es inferior a 35 años.

En mujeres mayores de 37 años sí que se encuentran diferencias estadísticamente significativas en la tasa de embarazo a la hora de transferir 1HIGH vs 2 HIGH (44,45% vs 63,99%), por lo que en este caso si se podría aconsejar la transferencia de 2 HIGH, si bien la tendencia en los últimos años es transferir un solo embrión.

A pesar del bajo recuento muestral del que disponemos, todo parece indicar que se podría recomendar transferir un solo embrión de alto poder de implantación a mujeres con una edad igual o inferior a 37 años, en ovodonación y en esterilidades secundarias, sin comprometer la tasa de éxito del ciclo.

BIBLIOGRAFÍA

Archivo adjunto

TE:2

			EMBARAZO		ABORTO		EMB MULTIPLE	
			nº	%	nº	%	nº	%
2 HIGH n=118	OVO. PROPIOS	≤ 37años (n=67)	49	73,13%[b]	8	16,33%	18	36,73%
		> 37 años (n=30)	19	63,33%[c]	11	57,89%	2	10,53%
	OVO.DONANTE	≤ 35 años (n=21)	19	90,48%[dfg]	4	21,09%	5	26,32%
AL MENOS 1 HIGH n=63	OVO. PROPIOS	≤ 37años (n=29)	18	62,07%[e]	4	22,22%	5	27,78%
		> 37 años (n=21)	6	28,57%[f]	1	16,67%	1	16,67%
	OVO.DONANTE	≤ 35 años (n=13)	7	53,84%	2	28,57%	2	28,57%
NINGÚN HIGH n=66	OVO. PROPIOS	≤ 37años (n=39)	19	48,72%	4	21,05%	5	26,32%
		> 37 años (n=22)	6	27,27%[g]	2	33,33%	1	16,67%
	OVO.DONANTE	≤ 35 años (n=5)	3	60,00%	2	66,67%	2	66,67%

TABLA 2. Porcentaje de embarazo, aborto y embarazo múltiple en transferencias de dos embriones en función de la edad y la calidad de los embriones transferidos. p<0,05

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-107: PORCENTAJE DE ANEUPLOIDÍAS EN EMBRIONES PROCEDENTES DE OVOCITOS DE DONANTE

C. González Navas, E. Criado Scholz
FIV MARBELLA, Marbella, Málaga

INTRODUCCIÓN

Las aneuploidías son una de las causas más frecuentes de fallos de implantación y abortos que afectan a los resultados de FIV.

Recientemente, se ha encontrado que una alta proporción de embriones humanos aneuploides procedentes de pacientes jóvenes sometidas a tratamientos de FIV. Las donantes de ovocitos son mujeres sanas, jóvenes y fértiles, sin embargo los ovocitos de las donantes son recogidos mediante una estimulación ovárica controlada con altas dosis de gonadotropinas y sus ovocitos quedan expuestos al ambiente y manipulación de las técnicas de fecundación in vitro. Recientemente se ha visto en algunos estudios que existe una alta tasa de aneuploidías (53.2%) en embriones procedentes de ovocitos de donante y un 88.1% de esas aneuploidías parecen proceder de la parte materna (Haddad et al., 2015).

OBJETIVO

Evaluar el porcentaje de embriones aneuploides en los tratamientos de PGS procedentes de ovocitos de donante en nuestro centro.

MATERIAL Y MÉTODO

Se analizaron 49 casos de donación de ovocitos en los que se realizó screening de aneuploidías mediante las técnicas karyolite o array-CGH en los embriones resultantes entre 2015, 2016 y 2017.

La biopsia fue realizada en día 3 por el personal del laboratorio que realiza el análisis genético.

La media de edad de las donantes de ovocitos fue 25,7 años.

Calculamos el porcentaje de embriones aneuploides según los embriones analizados mediante PGS y que presentaron una o varias aneuploidías.

RESULTADOS

De 287 embriones biopsiados en día +3 a los que se realizó el diagnóstico genético preimplantacional, 121 resultaron euploides y 166 embriones fueron portadores de alguna o varias aneuploidías por tanto, el porcentaje obtenido en nuestro centro de embriones euploides procedentes de ovocitos de donante entre los años 2015, 2016 y hasta mayo de 2017, es de un 42,16% y 57,84% de los embriones presentaron alguna aneuploidía.

CONCLUSIONES

En conclusión, nuestro análisis indica que el porcentaje de aneuploidías es elevado en embriones procedentes de ovocitos de donante. Tasas similares de aneuploidías han sido observadas en pacientes con menos de 35 años con sus propios óvulos o en receptoras con ovocitos de donante indicando que las aneuploidías no son un factor que afecta sólo a embriones procedentes de ovocitos de pacientes con edad avanzada sino que también a pacientes jóvenes y donantes de ovocitos (Haddad et al., 2015).

En otros estudios se ha reportado una tasa de aneuploidías en embriones procedentes de ovocitos de donante del 53.2% (Sills et al., 2014) siendo más elevada (60,9%) según el estudio de Haddad et al., 2015.

Según estos resultados pensamos que el PGS debería ser una técnica rutinaria en todos los tratamientos de FIV, incluso en los tratamientos con donación de ovocitos para asegurar la transferencia de un embrión euploide lo que nos llevará a conseguir tasas más elevadas de embarazo evolutivo y reducir la tasa de aborto.

No obstante, seguiremos ampliando este estudio para poder llegar a conclusiones significativas.

BIBLIOGRAFÍA

1.- Haddad G, Deng M, Wang CT, Witz C, Williams D, Griffith J, Skorupski J, Gill J, Wang, W. Assessment of aneuploidy formation in human blastocysts resulting from donated eggs and the necessity of the embryos for aneuploidy screening. J Assit Repod Genet.2015; 32:999-1006.

2.- Sills E, Li X, Frederick JL, Khoury CD, Potter DA. Determining paternal origin of embryo aneuploidy: analysis of genetic error observed in 305 embryos derived from anonymous donor oocyte IVF cycles. Mol Cytogenet. 2014; 7:68.

Embriones biopsiados en día 3			
Nº embriones biopsiados	Nº embriones euploides	% emb. euploides	% emb. aneuploides
287	121	42,16 %	57,84%

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-108: SLOW FREEZING IS STILL THE SEMEN CRYOPRESERVATION TECHNIQUE OF CHOICE DUE TO ITS CLINICAL OUTCOMES IN PATIENTS WITH AZOOSPERMIA

A. Palomar Rios (1), A. Gascón Sánchez (1), J.V. Martínez Sanchis (1), S. Sadeghi (2), M.J. Soriano Ortega (1), S. Balasch Parisi (3), I. Molina Botella (1)
(1) Unidad de Reproducción Asistida, Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, Valencia, España, (2) Departamento de Fisiología Animal y Antropología Física, Universidad de Valencia, Valencia, España, (3) Departamento de Estadística e Investigación Operativa Aplicadas y Calidad, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España

INTRODUCTION

Sperm cryopreservation has been widely used in artificial reproduction techniques. Indications for sperm cryopreservation include donor insemination, cryopreservation prior to malignancies and avoiding repeated surgical sperm retrievals in azoospermic patients. During cryopreservation process, negative effects related to rapid temperature decrease, such as osmotic injury, cellular dehydration, intra-cellular ice crystal formation, and oxidative stress lead to damage the sperm function. After cryopreservation, the detrimental effects on the sperm membrane mentioned above, result in a large increase in the percentage of poorly motile sperm or sperm with abnormal morphology. However, viable spermatozoa after freezing/thawing maintain their fertilization potential, so the reproductive outcomes should not be affected after ICSI cycles in which viable spermatozoa are injected. Moreover, storage of frozen semen of azoospermic patients avoids the need of scheduling oocyte retrieval and sperm retrieval surgery. Taking into account the range of clinical applications of sperm cryopreservation, a comparative study of clinical outcomes between fresh and cryopreserved semen samples should be strongly recommended in order to assess the safety of the use of frozen semen.

OBJECTIVES

The aim of this study is to compare clinical results of fresh and frozen semen samples in patients with impaired semen quality.

MATERIAL AND METHODS

A retrospective study was held considering the clinical results after the use of fresh in men with severe oligoasthenozoospermia (SOA) or frozen semen of men presenting azoospermia (A) patients who underwent a surgical sperm retrieval technique (TESE, testicular sperm extraction or PESA, percutaneous epididymal aspiration) in order to compare the use of fresh or frozen semen samples in patients presenting impaired semen quality. In SOA patients, spermatozoa used for ICSI were obtained after a centrifugation step from fresh ejaculate due to the initial semen quality did not allow selection technique such as swim-up or density gradients. A centrifugation step was also performed in order to collect all spermatozoa of the thawed sample in azoospermic patients. The retrospective study comprises a 5 year period and includes 587 cycles with fresh semen and 568 cycles with frozen/thawed semen. SOA patients were considered as the control group, in which fresh semen was used while patients who underwent TESE/PESA were considered the study group, in which frozen semen was used. Fertilization, implantation and pregnancy rates were considered. T-test of independent samples was performed. P-values

RESULTS

The use of fresh or frozen semen in men with severe male factor (SOA and A) do not affect the clinical outcome. Fertilization rates (FR) per oocyte microinjected (59,22±12,07% vs 58,47±12,43%), implantation rate (IR) (14,81±9,24% vs 18,58±9,45%) and pregnancy rate per cycle (PR) (35,71±15,87% vs 35,1±21,62%) were obtained from SOA patients and azoospermic patients respectively. No differences were observed in FR per oocyte, IR, or PR ($P > 0.05$ in all cases). Regarding the group of azoospermic patients who underwent TESE or PESA, the sperm retrieval technique did not show any effect on the FR per oocyte (58,08±11.80 vs 62,05±13,86), IR (16,70±9,13 vs 18,05±8,35) or PR (39,93±17,45 vs 44,80±27,44), in all cases $P > 0.05$. Finally, no differences were observed in FR per oocyte (61,23±11,73 vs 51,92±12,37), IR (22,65±13,22 vs 16,55±8,61) or PR (30,66±27,24 vs 31,81±21,84) regarding the type of azoospermia, obstructive (OBA) or non-obstructive azoospermia (NOA) respectively, $P > 0.05$ in all cases.

CONCLUSIONS

In this study has been demonstrated that even in patients who present poor semen quality baseline, as in cases of SOA or A, the use of frozen semen not only do not affect reproductive outcomes but also avoid certain inconveniences to the patient. Semen cryopreservation does not require repeated surgeries to recovery spermatozoa, also patient scheduling is easier.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-109: MEDIO ÚNICO O SECUENCIAL. UN ESTUDIO PROSPECTIVO ALEATORIO

L. Rodríguez Menes, F. Graña Zanón, D. Llaneza Suárez, P. Nieto Olmedo, V. Sánchez Blasco, C. Alvarado Franco, E. García Álvarez, D. Bigotes Álvarez, J.C. Quintana Paunette, P. De la Fuente Ciruelas
CEFIVA, Oviedo, Asturias

INTRODUCCIÓN

La composición de los medios de cultivo es clave para un buen desarrollo embrionario.

Actualmente se ha desarrollado dos tipos de medios de cultivo:

Los medios secuenciales que proporcionan las sustancias adecuadas a cada estadio de desarrollo del embrión, y el medio único, basado en que el embrión va utilizando lo que necesita en cada momento.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio es comparar cómo se comportan en nuestro laboratorio los embriones en los diferentes medios de cultivo.

MATERIAL Y MÉTODO

Se han asignado, de manera aleatoria, los embriones de 32 donantes de ovocitos (desde septiembre de 2015 a Abril de 2016) a los dos medios de cultivo diferentes Grupo 1: cultivo con medio único (Origio) y Grupo 2: medio secuencial (Origio).

Para la comparación de proporciones se ha utilizado el método exacto de Fisher o la Ji-cuadrado, dependiendo del número de datos.

RESULTADOS

Las tasas de gestación por transferencia para el medio secuencial fueron 46,15% en fresco y 20% en congelados, con una tasa de abortos del 11%. En el medio único fueron 45.45% en fresco y 21.05% en congelados, con una tasa de abortos del 33%. Ninguna diferencia resulto significativa.

El porcentaje de embriones útiles fue del 53% en ambos grupos.

CONCLUSIONES

No se han encontrado diferencias significativas entre los diferentes grupos, de hecho las tasas de resultados son similares en nuestro laboratorio. Aun así, continuaremos con el análisis de datos para aumentar la potencia del estudio.

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-110: TRANSPORTE DE OVOCITOS, ¿EXISTE RELACIÓN ENTRE LOS DISTINTOS TIPOS DE TRANSPORTE Y LA VIABILIDAD DE LOS OVOCITOS AL DESVITRIFICARLOS?

B. López Lería, E. Criado Scholz
FIV MARBELLA, Marbella, Málaga

INTRODUCCIÓN

La donación de ovocitos se ha convertido en una parte fundamental en los Tratamientos de Reproducción Asistida (TRA). En los últimos años la demanda de ovocitos de donante ha aumentado, ya que se ha convertido en una alternativa en los ciclos de reproducción asistida (RA). La introducción de la crioconservación de ovocitos en los programas de donación ha supuesto muchas ventajas, simplificando la logística de los ciclos de RA, sin necesidad de sincronizar el ciclo menstrual entre donante y receptora. También ha propiciado el desarrollo de bancos de ovocitos de donante. En muchos países europeos, la donación de gametos "ha sido recientemente aprobada por ley", por lo que la incipiente necesidad de donantes de óvulos hace que muchos de ellos recurran a éstos, estando a menudo ubicados fuera de sus fronteras.

OBJETIVOS

El objetivo del estudio, ha sido analizar la posible influencia de distintos tipos de transporte en la viabilidad de los ovocitos vitrificados en nuestro banco, y que fueron mandados a distintos destinos fuera de España, a través dos tipos de envíos que describiremos a continuación, a lo largo de los dos últimos años.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon ovocitos en metafase II de donantes de entre 18- 31 años, obtenidos por punción folicular 36 horas después del depaceptyl, que han sido vitrificados siguiendo el protocolo de Kitazato (Cryotop) y almacenados posteriormente en tanques con Nitrógeno Líquido (LN2), en el laboratorio de nuestro centro. Para el transporte de ovocitos se emplearon contenedores Dry Shipper. Los tipos de envío fueron: Estándar Aéreo (EA), mediante empresa convencional de transporte y Lab to Lab (L2L), a través de personal de nuestro centro encargado de transportarlos desde la puerta de nuestro centro hasta la puerta del centro receptor. Desde Noviembre 2014 hasta Septiembre 2016, 5336 ovocitos fueron vitrificados y enviados a través de estos dos tipos de envío.

Se han analizado los datos de supervivencia procedentes de cada centro y por tipo de envío que han sido recogidos sobre una tabla de Excel para el posterior análisis.

RESULTADOS

En el estudio hemos analizado sólo la tasa de supervivencia, ya que en las demás tasas existen muchos otros factores que pueden afectar al resultado y no solo el transporte.

De los 5336 ovocitos enviados, 5262 desvitrificaciones han sido analizadas, 2278 ovocitos desvitrificados fueron enviados mediante empresas de transporte convencionales, y 2984 de los ovocitos desvitrificados fueron enviados mediante L2L.

Cuando analizamos la supervivencia por tipo de envío resulta ser más alta en lo envíos realizados mediante L2L, frente al Aéreo Estándar (74,9% vs 70,5%).

Total ovocitos enviados	5336
Total ovocitos desvitrificados	5262
Ovocitos desvitrificados enviados por EA	2278
Ovocitos desvitrificados enviados por L2L	2984

CONCLUSIÓN

Los datos indican que podría producirse algún tipo de daño en los óvulos, cuando éstos se envían por compañías de transportes "estándar". Probablemente se deba al manejo de los contenedores, la posible exposición a rayos x, el empleo de aviones comerciales de mercancías, etc.

Por tanto parece que el modo de transporte más seguro según los datos sea el L2L, ya que una persona cuida del contenedor en todo momento durante el transporte, desde el laboratorio de nuestro centro al laboratorio del centro receptor de los óvulos.

Como limitaciones del estudio, tenemos que los lotes de ovocitos enviados proceden de distintas donantes y estimulaciones, además han sido desvitrificados por distintos centros y profesionales, que aunque han seguido el protocolo establecido, puede haber limitado los resultados obtenidos.

Debido al continuo flujo en el envío de ovocitos, continuamos recibiendo resultados sobre la desvitrificación de éstos, por lo que deberemos seguir estudiando, analizando y profundizando en la influencia del tipo de envío en la viabilidad de los ovocitos al desvitrificarlos.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-111: INFLUENCIA DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES SUBOPTIMOS EN LOS RESULTADOS DE FECUNDACIÓN IN VITRO

M.C. Concepción Lorenzo, R. Vaca Sánchez, R. Blanes Zamora, J. González Pérez, D.R. Baez Quintana, A. Fernández Rodríguez, R. N. Rodríguez Díaz, M. Correa Rancel, Y. Suarez Hernández, V. J. Carballo Lorenzo
Hospital Universitario de Canarias, San Cristobal de la Laguna, Santa Cruz de Tenerife

INTRODUCCIÓN

La categorización embrionaria ha permitido una mejor selección de embriones viables para la transferencia pero aún existen interrogantes sobre si es adecuado el método tradicional de valoración morfológica o si será sustituído definitivamente por la evaluación morfocinética time-lapse. Seguir unos parámetros de clasificación embrionaria estandarizados como los criterios ASEBIR en la realización del trabajo de laboratorio ayuda a garantizar una correcta elección.

OBJETIVO

Discriminar en casos de cohortes embrionarias con un sólo embrión de categoría A o B, y el resto C o D, si el transferir un segundo embrión C o D, perjudica la tasa de gestación e implantación del embrión de buena calidad.

Determinar el grado de afectación de diferentes factores de esterilidad, cómo limitan la calidad embrionaria y conocer si existe un factor predominante asociado a embriones de baja calidad.

MATERIAL Y MÉTODO

Realizamos un estudio retrospectivo incluyendo 981 casos, 742 correspondientes a transferencias en fresco de dos embriones y 239 de un embrión procedentes de ciclos con ovocitos propios donde el 67,99% fueron ICSI, 30,58% FIV convencional y en el 1.43% se empleó técnica mixta FIV/ICSI. La edad media de las pacientes fue de 34,87 ± 3,73 años.

Se reagrupan los casos según la calidad de embriones trasferidos sean grado A, B, C o D. Así pues, dentro del grupo de transferencia de dos embriones tendremos las combinaciones: A-A, B-B, C-C, D-D, A-B, A-C, A-D, B-C, B-D y C-D considerando embriones de buena calidad los grado A o B.

El cultivo embrionario se realizó usando medios secuenciales e incubadores al 6%C02 y Tª 37ºC, la posterior transferencia embrionaria fue ecoguiada.

RESULTADOS

Los grupos más numerosos fueron el A-A el A-A (N=223), el A-B (N= 114) y el B-B (N=145) que también se corresponden con mayores tasas de gestación, 40,4%, 34,5% y 33,3% respectivamente. La tasa de gestación gemelar más elevada la encontramos en el A-A (12,6%). El número de casos en que sólo existía únicamente un embrión para transferir y éste se correspondía con un grado D fue de 5.

Si transferimos un embrión de calidad A obtenemos una tasa de gestación del 19,2% pero si añadimos junto a éste uno de calidad C subirá hasta el 25,4%. Si transferimos uno B es del 12,7% y añadiendo otro C a éste alcanza el 19,8%.

No obtuvimos embarazo con transferencias de embriones de calidad D salvo para la combinación B-D (11,1%).

Si comparamos la tasa de implantación de embriones A o B frente al resto, obtenemos diferencias significativas entre transferencia de dos embriones de calidad A (p= 0.000) o uno A y uno B (p=0.008), frente a uno o dos embriones de cualquier otra combinación de categoría inferior. No hay diferencias significativas entre transferir un embrión A y un B (p=0,944).

Respecto a la influencia de la patología de la esterilidad sobre la calidad, el porcentaje medio de embriones de buena calidad para el grupo con indicación mixta, ambos miembros de la pareja implicados, es de 6,67%, en cambio cuando es sólo el factor femenino es 50,49%, para masculino 51,28% y para esterilidad de origen desconocido 50,71% (p=0.000).

CONCLUSIONES

La transferencia exclusiva de embriones de calidad D otorga una probabilidad ínfima de embarazo en este estudio.

Añadir un embrión de categoría C frente TES-1 de A o B implica diferencia significativa aumentando la tasa de gestación.

Cuando el factor de esterilidad es mixto, el porcentaje de embriones de buena calidad es significativamente menor al observado con otras causas de esterilidad.

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-112: AVENTURAS Y DESVENTURAS EN LA ACREDITACION DE LA NORMA UNE 179007 PARA LABORATORIOS DE REPRODUCCION ASISTIDA

J.L. Gámez Prieto, M. Lierta Sancho, L. del Molino Álvarez, C. de Bonrostro Torralba, I. Giménez Blasco, J. Marqués Galán, A. Urries López
Unidad De Reproduccion Asistida del Hospital QuironSalud Zaragoza, Zaragoza

INTRODUCCIÓN

Día tras día perseguimos la excelencia en la gestión de la calidad de nuestros laboratorios de reproducción humana asistida. Tras surgir la norma UNE 179007 se establecen unos requisitos mínimos, tanto humanos como de infraestructuras y de ambiente de trabajo para su gestión, y se establecen una serie de indicadores que marquen las condiciones de trabajo óptimo del laboratorio.

OBJETIVO

Como punto de partida nos planteamos si con las estructuras y equipamiento de los que habitualmente disponen los laboratorios "tradicionales" como el nuestro, se podría afrontar la adecuación de la unidad de reproducción a todos los requisitos indicados en la norma sin que suponga una gran inversión en tiempo y/o dinero. Imprescindible es la unificación de criterios de gestión de calidad, planificación mediante la gestión de procesos, ajuste a normativa legal y la existencia de una adecuada comunicación con pacientes y proveedores. Aplica a las Unidades Asistenciales de Laboratorio de Andrologia, Laboratorio de Embriología y Laboratorio de Crioconservacion (U28, U29, U30, U31 y U32).

MATERIAL Y MÉTODO

El documento que nos sirve como guía para el proyecto es la propia norma UNE 179007: Sistema de gestión de la calidad para laboratorios de reproducción asistida. Revisamos la norma para descubrir aquellos puntos más críticos que nos podrían generar problemas a la hora de enfrentarnos a ella:

1.- Espacios de trabajo: acceso restringido con 3 áreas separadas: administrativa, laboratorios y almacén. Separación física entre el laboratorio de embriología y de andrología. Área específica para la crioconservación de gametos y preembriones. Paredes, techo, y suelo de material no poroso, liso y de fácil acceso para la limpieza y desinfección, recubiertas de pinturas tipo "epoxy". Espacios diferenciados para que los embriólogos puedan dar información a los pacientes, y otro para la obtención de muestras de semen.

2.- Mantenimiento preventivo de los equipos de laboratorio: anual, mensual o quincenal según equipo. Imprescindible en equipos críticos (incubadores, cabinas, placas calefactadas,...)

3.- Ambiente de trabajo: revisión de los protocolos de limpieza y desinfección del laboratorio y equipos. Listado de necesidades para cada área de trabajo. Acceso con vestuario adecuado para el personal.

4.- Requisitos humanos: adecuar el número de embriólogos al volumen de trabajo.

5.- Documentación mínima necesaria: existencia de un Manual de Calidad del Laboratorio y de PNT´s normalizadas con estructura adecuada a la norma.

6.- Climatización y filtrado de aire: regulación de la temperatura (22-26ºC) y medición continuada de esta. Filtrado del aire entrante al laboratorio mediante filtros absolutos HEPA debiendo ser renovado mínimo 15 veces/hora y produciendo un sistema de presión positiva entre 5-20 pascales. Realización de controles periódicos de compuestos orgánicos volátiles y controles microbiológicos.

7.- Iluminación con fuentes de luz cálida, regulables y cerradas.

RESULTADOS

Reseñar que la mayor parte del esfuerzo nos lo ha supuesto el ajuste de la Documentación de la Unidad (Manual de Calidad y PNT s) al formato exigido por la norma. Otro punto a destacar ha sido la comprobación de un adecuado sistema de ventilación que generara una presión positiva de entre 5-20 pascales con sistema de filtros adecuado. También debimos sustituir el sistema de luces por pantallas led de luz regulable y cálida (2700-3000 K). El tema de los registros diarios merece mención aparte dado el esfuerzo adicional que ello supondrá en el día a día de nuestra actividad rutinaria.

CONCLUSIONES

Tras enfrentarnos a este proyecto, concluimos que debemos perder el miedo a afrontar este tipo de acreditaciones ya que si "estamos haciendo bien nuestro trabajo" sería sencillo conseguirlas prestando un poco de atención a algunos puntos críticos particulares que son fácilmente solventables.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-113: ESTUDIO PILOTO SOBRE EL EFECTO DE LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL Y DISRUPTORES ENDOCRINOS SOBRE GAMETOS Y EMBRIONES EN NUESTRA REGIÓN.

V. Castañón Bernardo (1), L. Sánchez Castro (1), D. Llaneza Suarez (2), C. Fernández Ferrera (1), M. Vicente Santos (3), P. Llaneza Coto (1)
(1) Unidad de Reproducción. Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Oviedo, Asturias (2) CEFIVA. Centro de Fertilización in VItro de Asturias, (3) Atención Primaria. Salamanca

INTRODUCCIÓN

En los últimos años el número de parejas subfértiles ha aumentado debido a diferentes motivos. Un hecho indiscutible es por ejemplo el descenso en los niveles de normalidad del seminograma. Muchos estudios relacionan los tóxicos ambientales con distintos problemas de salud. En cambio, en lo relativo a su influencia sobre la reproducción humana no hay tantos estudios, además de existir controversia.

Nuestra hipótesis es que el hecho de vivir en un ambiente con niveles elevados de tóxicos conlleva peores resultados de las técnicas de reproducción asistida (TRA): calidad ovocitaria, espermática y embrionaria.

OBJETIVO

- Comparar la tasa de madurez ovocitaria y los parámetros seminales de pacientes que residan en zonas rurales no contaminadas frente a los que residan en zonas más contaminadas.

- Realizar esa misma comparación considerando grupos expuestos a los que tienen algún riesgo derivado de su ocupación profesional o de su estilo de vida (tabaco y alcohol).

- Comparar la tasa de fertilización y la calidad embrionaria en el grupo expuesto a contaminantes (residencia, ocupación, estilo de vida) frente al grupo no expuesto.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio de cohortes descriptivo y observacional prospectivo. El criterio empleado para considerar la exposición a tóxicos ambientales es la densidad poblacional y consideramos ambientes rurales y por tanto con exposiciones menores, los que tienen <150000 habitantes/km2. El riesgo profesional era medido por la exposición a sustancias tóxicas durante la jornada laboral (sí/no).

Se reclutaron 129 pacientes (64 parejas y 1 mujer sola). 65 mujeres de las que 48 vivían en zona urbana, 13 tenían riesgo profesional, 9 fumaban y 8 bebían y 64 hombres de los que 43 vivían en zona urbana, 17 tenían riesgo profesional, 15 fumaban y 16 bebían.

En todos ellos se midieron diferentes parámetros relativos a TRA: Madurez ovocitaria, calidad espermática, tasa fertilización, calidad embrionaria según clasificación ASEBIR, tasa de embarazo.

RESULTADOS

En mujeres, no encontramos cambios en dosis de gonadotropinas, nº ovocitos, madurez, tasa de fertilización, embriones de calidad óptima dependiendo del lugar de residencia, riesgo profesional, tabaquismo y consumo de alcohol

En otras variables encontramos tendencias aunque no significativas, las mujeres de zonas urbanas necesitaban más dosis de gonadotropinas (2212 vs 2097 UI), y las fumadoras también (2313 vs 2161 UI). En zonas urbanas se observó mayor madurez ovocitaria (91% vs 86%). Finalmente , las mujeres con riesgo ocupacional generaban un 42% de embriones de buena calidad (A y B) frente al 50% y las fumadoras un 43% vs 49% en no fumadoras.

Los hombres que vivían en zonas rurales tenían mayor volumen seminal (3.54 vs 2.54 ml, p= 0,04), en fumadores menor volumen (2.3 vs 3 ml). Sorprendentemente los hombres con riesgo ocupacional tenían una concentración espermática de 62.53 vs 58.95 mill/ml (p=0.049). Finalmente, los hombres con riesgo profesional generaban un 32.18% embriones A y B vs 54.13% de los que no presentaban un riesgo ocupacional (p=0,02).

La tasa de embarazo global fue del 32.36% y no se observaron diferencias significativas en los diferentes grupos.

CONCLUSIONES

Características seminales como el volumen espermático y el porcentaje de embriones de calidad generados por los varones son los aspectos sobre los que más influyen los factores ambientales analizados; lugar de residencia y riesgo ocupacional, respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

Barazani Y, Farrel Katz B, Nagler H, Sol Stember D. Lifestyle, environment, and male reproductive health. Urol Clin N Am 2014;41:55-66.

Checa M.A, González-Comadran M, Jacquemin B . Outdoorair pollution and human infertility: a systematic review. Fertility and Sterility 2016;106(4):897-904.

Lafuente R, García-Blázquez N, Jacquemin B, Checa M.A. Outdoor air pollution and sperm quality. Fertility and Sterility 2016;106(4):880-896.

Petersen MS, Halling J, Weihe P, Jensen TK, Grandjean P, Nielsen F, Jorgensen N. Spermatogenic capacity in fertile men with elevated exposure to polychlorinated biphenyls. Environ Res 2015;138:345-351.

Sharma R, Biedenharn K, Agarwal A. Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. Reproductive biology and endocrinology 2013;11:66.

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-115: TRANSFERENCIA SELECTIVA DE UN EMBRIÓN EN CICLOS DE FIV/ICSI EN MENORES DE 38 AÑOS NO DISMINUYE LA TASA ACUMULADA DE GESTACIÓN Y DISMINUYE LA TASA DE GESTACIÓN MÚLTIPLE

C. Alonso Muriel, M. Lara Lara, B. Buch Tomé, C. Segura García, R. Garnica Sarria, C. Álvarez Pinochet
Unidad de Reproduccion Centro Gutenberg, Málaga

INTRODUCCIÓN

El embarazo es considerado una complicación iatrogénica de las técnicas de reproducción asistida, ya que se asocia a un aumento en el riesgo de complicaciones perinatales y morbimortalidad perinatal. En un ciclo de FIV/ICSI, la transferencia selectiva de un embrión (SET) anula casi por completo la posibilidad de gestación múltiple y sus complicaciones. A priori, la SET puede impresionar que se traduce en una menor tasa de embarazo, pero los actuales métodos de cultivo, valoración y selección embrionaria y el desarrollo de la actual técnica de vitrificación hacen que la tasa global de gestación no se vea disminuida y con menos riesgos de gestación múltiple.

OBJETIVO

Evaluar la eficacia y eficiencia de la SET en pacientes menores de 38 años.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio retrospectivo de 126 pacientes (ciclos) menores de 38 años sometidas a FIV/ICSI durante los años 2012 a 2016, sin factor masculino severo asociado y con reserva ovárica normal, con transferencia en fresco en D+3 o D+5 y con congelación de embriones sobrantes. En 63 pacientes se realizó una SET y en 63 una DET (transferencia de dos embriones). La decisión de transferir uno o dos embriones fue un consenso entre el profesional clínico y los pacientes. A las pacientes que no gestaron en el ciclo en fresco se realizaron una criotransferencia de SET o DET según consenso. Se evaluó tasas de gestación por ciclo, de gestación múltiple por ciclo, tasa de gestación y gestación múltiple acumulada.

RESULTADOS

La edad media del grupo SET fue de 32.4 años y del grupo DET de 33 años. La tasa de gestación en fresco fue de un 52% (33/63) en el grupo SET de un 79% (50/63) en el grupo DET (p=0.0014). La tasa de gestación múltiple en el ciclo en fresco fue de un 38% en el grupo DET, en el grupo SET no hubo gestaciones múltiples en fresco (P=0.0001). En el ciclo de Criotransferencia, en el grupo SET (30 pacientes), en 7 ciclos hubo transferencia SET con un 57% (4/7) de gestación, sin gestaciones múltiples y en 23 se transfirieron 2 embriones electivos con una gestación de un 78% (18/23), con un 38.9% de gestación múltiple en este subgrupo. La tasa de gestación acumulada después de dos transferencias embrionarias fue de un 87.3 % (55/63) en el grupo SET y de un 87.3% (55/63) en el grupo DET (P=1.0000). La tasa de gestación múltiple acumulada en el grupo SET fue de un 12.73% (7/55) y de un 41.8% (23/55) en el grupo DET (p=0.85).

CONCLUSIONES

La transferencia selectiva de un embrión es una herramienta eficaz y eficiente ya que no disminuye las posibilidades reales de embarazo y disminuye sustancialmente el riesgo de gestación múltiple en el grupo etario de estudio. Estos resultados solo son posibles con un buen criterio de cultivo y selección embrionaria, dentro de una correcta y madurada técnica de vitrificación. Es necesaria la educación a los pacientes para disminuir la ansiedad que produce la indicación o sugerencia de SET. Se hace imprescindible más revisiones al respecto para mejorar el poder estadístico de los resultados encontrados.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-116: COOPERACIÓN EMBRIONARIA

M. Martínez Saez, M. Guijarro Notario, B. Sánchez Ruiz, M. Lastra Salazar, M. Hebles Duvison, L. Aguilera Duvison, P. Piqueras Trilles, J. Moreno Moya, F. Sánchez Martín, P. Sánchez Martín
Clínicas Ginemed, Sevilla

INTRODUCCIÓN

Cada día aparecen más casos de embarazo múltiple, sobre todo desde la puesta en marcha de las técnicas de reproducción asistida. Los casos en los que se realizan transferencias de más de un embrión son cada vez más abundantes, y aunque las clínicas cada vez orientan más sus tratamientos hacia la consecución de embarazos de un solo embrión, hay que seleccionar algunos casos en los que puede ser conveniente la transferencia de más de un embrión para conseguir este mismo resultado. Se han realizado estudios comparativos en los que se muestran que los riesgos de una gestación gemelar tras un tratamiento de reproducción asistida son menores que aquellos producidos por gestaciones espontáneas, quizás debido al ser menos frecuentes los embarazos monocoriales.

OBJETIVO

Con este estudio se quiere analizar el beneficio de transferir más de un embrión partiendo de la idea de que los embriones cooperan entre ellos en la implantación y consecución de un embarazo evolutivo.

MATERIAL Y MÉTODO

Se analiza de forma retrospectiva los resultados de transferencias de pacientes que han elegido transferir uno, dos o tres embriones, siendo al menos uno de ellos de calidad A según los criterios Asebir, no incluyendo en el análisis los casos en los que no hay más embriones que los transferidos. Los datos recogidos incluyen el primer semestre de 2016.

RESULTADOS

Cuando se analizan los resultados, se observa que al transferir dos embriones, la tasa de embarazo evolutivo es mayor que la esperada si consideramos la implantación de cada embrión de forma independiente: siendo p la probabilidad de implantación y embarazo evolutivo (calculada a partir del número de transferencias de un embrión), se esperará que la probabilidad de implantación de dos embriones sea p2, o de tres (en casos de pacientes de óvulos propios que así lo desean), p3.

Por lo tanto, si hablamos de nacimientos, en pacientes de óvulos propios se observa que al hacer transferencias de un solo embrión obtendremos un 42% de niños nacidos; sin embargo al realizar transferencias de dos embriones obtendremos un 30.5% de embarazos gemelares y 28.3% de gestaciones simples. Si hablamos en términos de transferir dos embriones a 100 mujeres nacerán 89 niños, 61 de ellos de gestaciones gemelares y 28 de gestaciones simples.

En el caso de pacientes de ovodonación al realizar transferencias de 1 solo embrión, si consideramos 100 transferencias obtendremos el nacimiento de 46 niños, mientras que si transferimos 2 embriones a esas mismas 100 mujeres nacerán 110 niños, de los cuales 83 procederán de embarazos gemelares (41,5 %) y 27 de gestaciones simples. Los datos se encuentran recogidos en las tablas 1 y 2.

CONCLUSIONES

Este estudio nos puede ayudar a decidir en qué circunstancias puede ser asumible un riesgo de embarazo múltiple, puesto que si los embriones cooperan entre ellos, el riesgo que se asume al transferir más de un embrión se ve compensado por el beneficio de un embarazo evolutivo, que no siempre será múltiple.

No en todos los casos resultará beneficioso realizar la transferencia de más de un embrión, como pueden ser las pacientes más añosas, en las que las complicaciones obstétricas pueden ser mayores, o en aquellas cuya causa de esterilidad tenga origen inmunológico, pero si es posible identificar aquellos casos en los que se pueda obtener un beneficio se ha de tener en cuenta.

COOPERACIÓN EMBRIONARIA

Tabla 1

Propios	SET	DET		TET		
Nº sacos	1	1	2	1	2	3
Esperado (%)	42	48	16	28	20	7
Observado (%)	42	28,3	30,6	26,1	13,1	8,2

Tabla 2

OVODON	SET	DET	
Nº sacos	1	1	2
Esperado (%)	46,1	49,7	21,3
Observado (%)	46,1	26,8	41,5

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-117: LAS MUJERES MUY JÓVENES POSEEN UN ALTO RIESGO DE ANEUPLOIDÍAS EMBRIONARIAS

B. Lledó Bosch, J. Guerrero Villena, J. Llácer Aparicio, J.A. Ortiz Salcedo, R. Morales Sabater, E. García Hernández, R. Bernabeu Pérez
Instituto Bernabeu, Alicante

INTRODUCCIÓN

Las aneuploidías embrionarias son muy frecuentes en embriones preimplantatorios y su frecuencia está asociada a factores maternos y paternos. El principal factor responsable de las aneuploidías embrionarias es la edad materna. Está totalmente demostrado que la edad materna avanzada está asociada a un incremento en las tasas de aneuploidías embrionarias que podrían ser responsables de la disminución en las tasas de implantación y las altas tasas de aborto. El empleo de las técnicas de CCS (Screening Cromosómico Completo) han aportado gran cantidad de datos que permiten esclarecer el efecto de la edad en las aneuploidías. Sin embargo, dado que la mayoría de mujeres que acuden a clínicas de reproducción asistida poseen edad materna avanzada resulta difícil conocer cuál es la tasa de aneuploidías en mujeres muy jóvenes.

OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo ha sido conocer si existe un mayor riesgo de aneuploidías embrionarias en mujeres muy jóvenes. Para ello, hemos analizado en primer lugar la tasa de abortos en ciclos de donación de ovocitos en donantes muy jóvenes (<20 años), así como la tasa de aneuploidías en mujeres jóvenes (<30 años) sometidas a CCS.

MATERIAL Y MÉTODO

Se ha llevado a cabo un estudio retrospectivo. Por un lado, se han comparado los resultados de 514 ciclos de donación de ovocitos diferenciado dos grupos en función de la edad de la donante (< de 20 y ≥20 años). Por otro lado, se han analizado 1040 aCGH de biopsias de blastocistos procedentes de 376 ciclos de CCS en función de la edad de la paciente (<21, 22-25, 26-30, >30 años). El CCS fue indicado en pacientes que acudieron a nuestro centro por fallo de implantación, abortos de repetición o factor masculino severo. Para el análisis genético, previamente se amplificó todo el genoma con el kit comercial Picoplex® y la plataforma de aCGH SureprintG3 8x60K Agilent®. El análisis estadístico empleado consistió en una t-student para variables continuas y chi-cuadrado para variables categóricas. Para identificar factores de confusión se realizó una regresión logística (SPSSv20.0).

RESULTADOS

De los ciclos de donación de ovocitos incluidos en el estudio no observamos diferencias estadísticamente significativas en las tasas de beta positiva (60.0% vs 67.0%; p=0.346), embarazo clínico (51.1% vs 55.9%; p=0.540) y de implantación (45.3% vs 47.2%; p=0.787) entre los dos grupos de donantes. Sin embargo, se observa una mayor tasa de aborto (43.5% vs 15.6%; p<0.001) en el grupo de donantes menores de 20 años. Respecto a los ciclos de CCS, analizando la tasa de aneuploidías de forma continua con la edad, como era de esperar, se observa un incremento de las aneuploidías conforme se incrementa la edad materna (p<0.05). La mayor tasa de aneuploidías se observa en mujeres de 43 años (83%). Respecto al análisis en el rango de mujeres jóvenes (<30 años) la mayor tasa de aneuploidías embrionarias se observa en pacientes con 21 años (52.2%). Se realizó un análisis estratificado de los resultados en diferentes rangos (<21, 22-25, 26-30, >30) que mostró diferencias estadísticamente significativas (p<0.05). La prevalencia de aneuploidías fue menor en el grupo de 22-25 años (24.1%). Sorprendentemente, el grupo de pacientes menores de 22 años mostró una tasa de aneuploidías del 40%.

CONCLUSIONES

Con estos resultados podemos concluir que las mujeres muy jóvenes presentan un mayor riesgo de aborto probablemente producido por un mayor incremento en las aneuploidías embrionarias. Avances en el conocimiento de los diferentes mecanismos que pueden producir aneuploidías durante la gametogénesis femenina nos ayudará a entender los resultados obtenidos.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-118: UTILIDAD DEL CONOCIMIENTO DE LOS NIVELES DE ESTRADIOL Y PROGESTERONA EN LAS TRA

I.M. Sánchez Castelló, C. Salvador Ballada, P. Francia García, M.V. Rodríguez García, M. Rivera Bazo, J. Hernández Hernández
Hospital San Pedro, Logroño, La Rioja

INTRODUCCIÓN

La sincronía entre embrión y endometrio, así como la presencia de un microambiente adecuado, son factores fundamentales para que se produzca la implantación. La consecución de este microambiente pasa por que el endometrio presente un estado óptimo en el momento en el que se va a producir la implantación. La principal responsable de que se produzca una diferenciación adecuada de las células endometriales es la progesterona. Niveles adecuados de progesterona van a permitir que el endometrio presente las condiciones adecuadas para conseguir el microambiente uterino que favorezca la implantación. Sin embargo, como consecuencia de la estimulación ovárica controlada que se realiza en los tratamientos de reproducción asistida los niveles de progesterona se pueden ver incrementados en la fase folicular tardía, lo cual afecta de forma negativa a los resultados de las TRA. Junto con la progesterona, los niveles suprafisiológicos de estradiol que pueden alcanzarse debido al desarrollo multifolicular durante la estimulación también afectan a la ventana de implantación. Además el estradiol contribuye a la sintomatología del SHO, por lo que la presencia de niveles elevados o aumentos bruscos nos puede ayudar a predecir el SHO.

OBJETIVO

Nuestro objetivo es mostrar cómo la determinación de los niveles hormonales de las pacientes sometidas a punción nos ha permitido mejorar notablemente las tasas de implantación en aquellas con niveles hormonales alterados en las que se ha diferido la transferencia frente a las que tuvieron transferencia en fresco.

MATERIAL Y MÉTODO

Desde septiembre de 2016 se comenzaron a determinar el día del triggering los niveles de estradiol y progesterona en todas aquellas pacientes que se iban a someter a punción. Los datos que se presentan en este trabajo son los recogidos hasta abril del 2017. Consideramos como punto de corte para el estradiol 3500 pg/ml y para la progesterona 1,5 ng/ml. Niveles superiores a estos valores se consideran alterados.

RESULTADOS

Durante los 8 meses que disponemos de datos se han realizado un total de 21 ciclos con transferencia embrionaria diferidas, y en 8 de ellos se ha realizado ya la criotransferencia. Por otro lado, contamos con 13 ciclos en los que, a pesar de presentar niveles hormonales alterados, tuvieron transferencia en fresco. Las tasas de gestación por transferencia que encontramos son del 34% y del 23,5% respectivamente. El conocimiento de los niveles hormonales junto con las características ecográficas y el número de ovocitos recogidos en la punción nos ha permitido aumentar el número de ciclos con transferencia diferida, pasando de realizar 1 ciclo diferido cada 6 meses a realizar casi 3 ciclos al mes, con las mejores en las tasas de implantación que esto supone.

Esto es posible gracias a la implementación en nuestra Unidad de Reproducción de un buen sistema de vitrificación, que nos ha permitido equiparar en estos 8 meses el número de criotransferencias a las que se realizaron desde la apertura de dicha unidad en 2010, con un total de 34 frente a 36 respectivamente. Además hemos aumentado la tasa de supervivencia de los embriones vitrificados del 85% al 95%.

CONCLUSIONES

El conocimiento de los niveles hormonales ha supuesto un refuerzo a las características ecográficas y al número de ovocitos recogidos en la punción a la hora de decidir si realizaremos la transferencia embrionaria en fresco o en diferido, mejorándose nuestras tasas de implantación en pacientes con los niveles hormonales alterados.

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-119: CULTIVO DE EMBRIONES EN MEDIO ÚNICO O SECUENCIAL: ESTUDIO COMPARATIVO

I. López Pelayo, J.M. Gutiérrez Romero, A.I. Mangano Armada, M.M. Calero Ruíz, P.J. Moreno de Acevedo Yagüe
Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz

INTRODUCCIÓN:

Para el cultivo de embriones existen principalmente dos protocolos. Cultivo en medio único utilizando el mismo medio con todos los nutrientes necesarios durante el periodo preimplantacional ("Let de embryo choose"), o bien, cultivo en medio secuencial donde se utiliza un medio con los nutrientes necesarios hasta día 3 (D+3) y otro, con otros nutrientes hasta el final del periodo preimplantacional ("Back to nature").

OBJETIVO

Comparar la calidad, tasa de fecundación, implantación, gestación y aborto tras el cultivo de embriones en un medio único sin renovar en D+3 o en uno secuencial.

Comparar la tasa gestación y aborto acumulado sumando las transferencias de embriones vitrificados durante el estudio.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio retrospectivo randomizado en que se analizaron los embriones generados de 332 parejas mediante inyección intracitoplasmática de espermatozoides en 2016. Se comparó un medio único (SAGE 1-STEP, Origio) con uno secuencial (G1/G2TM plus, Vitrolife). El cultivo en cada uno se realizó según el día de la punción al azar. Con el medio secuencial se dieron pases de medio todos los días hasta D+3 y con el único se mantuvieron en el mismo medio hasta D+3. Por las características de nuestro centro, las transferencias se realizaron en día 2 (D+2) o D+3.

Los embriones se clasificaron según criterios ASEBIR y los de mejor calidad se vitrificaron. Se evaluaron las transferencias de embriones vitrificados durante 2016 según protocolo de vitrificación y desvitrificación respectivamente (Medicult Vitrification Cooling o Warming, Origio).

Para el análisis estadístico se utilizó SPSS 18.0 (Statistical package for the Social Sciences: Chicago,USA). Aplicamos la prueba U de Mann-Whitney para variables continuas y test de 2 para categóricas. Un valor p

RESULTADOS

No se encontraron diferencias en ambos grupos en cuanto a edad media de las mujeres (años) y respuesta ovárica (hormona anti-mülleriana, ng/mL) respectivamente: [único=34.55±3.69, secuencial=34.15±3.59 (p=0.277)], [único=2.94, secuencial=2.67 (p=0.268)].

Los resultados se resumen en las tablas del archivo adjunto donde se presentan los resultados del estudio comparativos de ambos grupos (Tabla 1) y la calidad y número de células de los embriones generados (Tabla 2).

La tasa de gestación acumulada añadiendo las transferencias de vitrificados realizadas en 2016 fue en medio único 36.66% y secuencial 30.00% (p=0.357). La tasa de aborto acumulada fue en medio único y secuencial respectivamente: 16.90% vs. 9.61% (p=0.266).

CONCLUSIONES

No se encuentran diferencias en la tasa de fecundación, implantación, gestación y aborto, pero si en la calidad de los embriones. Se obtienen embriones de mejor calidad cuando se cultivan en medio único. Por ello, se vitrifica un mayor número aunque luego no se encuentren diferencias en la tasa de gestación acumulada. Así, el rendimiento del ciclo es mayor cuando se cultivan en medio único.

Encontramos diferencias también en el número de células en D+2 y D+3 observando que el ritmo de división es más rápido con medio único.

Hemos demostrado el efecto del medio de cultivo en algunos aspectos, pero son necesarios más estudios para completarlo.

Tabla 1. Resultados comparativos de ambos grupos.

Tabla 2. Calidad y número de células de los embriones generados.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

Tabla 1. Resultados comparativos de ambos grupos.

	MEDIO ÚNICO	MEDIO SECUENCIAL	*P*
TASA FECUNDACIÓN	69.34%	67.20%	0.802
TASA IMPLANTACIÓN	22.41%	19.91%	0.242
TASA GESTACIÓN	38.58%	31.11%	0.737
TASA ABORTO	14.29%	9.52%	0.472
EMBRIONES VITRIFICADOS	453 (45.85%)	215 (28.10%)	0.000

Tabla 2. Calidad y número de células de los embriones generados.

		MEDIO ÚNICO	MEDIO SECUENCIAL	*p*
D+2	**CALIDAD**			
	A	379 (38.36%)	178 (23.26%)	0.000
	B	265 (26.82%)	173 (22.61%)	0.002
	C	336 (34%)	383 (50.00%)	0.250
D+3				
	A	105 (28.46%)	33 (14.67%)	0.036
	B	104 (28.18%)	66 (29.33%)	0.434
	C	147 (39.84%)	97 (43.11%)	0.465
D+2	**Nº CÉLULAS**			
	<4	149	233	0.013
	4	547	334	0.000
	5	169	104	0.042
	6	70	47	0.029
	>6	46	27	0.061
D+3				
	<7	81	91	0.026
	7-8	201	89	0.037
	9-10	66	27	0.091
	>10	21	18	0.797

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-120: LA ACTIVIDAD DE LA ANINOPEPTIDASA N (APN) Y LA CALIDAD EMBRIONARIA EN DÍA 3 DE DESARROLLO

N. González Espeja (1), A. Valdivia Palacin (2), N. Subiran Ciudad (3), M. Ferrando Serrano (1), Z. Larreategui Laiseca (1), J. Irazusta Astiazaran (3)
(1) IVI Bilbao, Leioa, Bizkaia, España, (2) Departamento de Biología Celular e Histología, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Leioa, Bizkaia, España, (3) Departamento de fisiología facultad de Medicina y Odontología , Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Leioa, Bizkaia, España

INTRODUCCIÓN

El potencial de los espermatozoides está determinada por numerosos factores y procesos fisiológicos. La mayoría de estos procesos están regulados a través de señales bioquímica necesarias para la comunicación celular. Muchas de estas moléculas son péptidos que actúan sobre receptores situados en la membrana del espermatozoide. El mecanismo principal para controlar la acción de estos péptidos sobre los espermatozoides son las enzimas (peptidasas) que los degradan y la APN es de gran importancia en la degradación de las peptidasas.

OBJETIVO

Establecer la relación entre la actividad enzimática aminopeptidasa N (APN) y la fragmentación embrionaria en día 3.

MATERIAL Y MÉTODO

Se usaron 83 muestras seminales obtenidas de pacientes que se sometieron a un tratamiento de reproducción asistida. Las muestras seminales se obtuvieron por masturbación tras 2-5 días de abstinencia. La microinyección intracitoplasmatica fue realizada por embriologos cualificados.Estas muestras se separaron en 3 fracciones (espermatozoides, líquido seminal y prostasomas). La actividad enzimática fue determinada mediante técnicas fluorimétricas. Se usaron sustratos sintéticos específicos, que liberan un producto fluorescente cuantificable debido a la acción de la enzima APN. La fragmentacón embrionaria fue analizada por embriologos especializados. Los resultados fueron analizados mediante correlaciones lineales entra la actividad enzimática y los parámetros seminales.

RESULTADOS

La actividad enzimática de APN en la fracción de líquido seminal fue correlacionada positivamente con el porcentaje de fragmentación embrionaria en día 3 de desarrollo embrionario. Por otro lado no se vieron correlaciones significativas entra la enzima APN en las fracciones de espermatozoides ni de prostasomas y la fragmentación embrionaria en día 3 de desarrollo.

CONCLUSIONES

Las alteraciones en el metabolismo de actividad de la enzima APN puede ser uno de los factores que intervienen en la calidad embrionaria. Por lo que el estudio del metabolismo de las peptidasa puede ser un marcador bioquímico para el diagnóstico de la infertilidad humana.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-121: SCREENING DE ENFERMEDADES RECESIVAS EN >7200 PACIENTES Y DONANTES. RESULTADOS EN UN PROGRAMA DE MATCHING

M. Palahi Bages, L. Álvarez Gómez, D. Campos Rodero, E. Garcia Guixé, E. Balius Fort, Á. Gómez Duro, E. Fernández García, C. Giménez i Sevilla, M. Sandalinas Alabert
Reprogenetics Spain, Barcelona

INTRODUCCIÓN

La aplicación de los test actuales de cribado de portadores permite reducir el riesgo de transmisión de enfermedades genéticas recesivas y ligadas al sexo. En la actualidad es posible analizar >300 enfermedades en un solo test.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es realizar un estudio descriptivo de la frecuencia y tipo de enfermedades observadas en los pacientes analizados así como evaluar los resultados obtenidos en el programa de matching mediante el panel completo.

MATERIAL Y MÉTODO

Se han analizado hasta 314 enfermedades genéticas recesivas y ligadas al sexo en un total de 7278 pacientes mediante Illumina's Infinium HD Genotyping Platform. Este test no detecta variantes de significado incierto. También se han analizado los resultados de 2948 matchings realizados entre donante/receptor (2441 matchings), entre donante/donante (400 matchings) o entre parejas (107 matchings).

RESULTADOS

El 46.33% de los pacientes analizados resultó ser portador de, al menos, una mutación. Las enfermedades más frecuentes fueron: Deficiencia de la Biotinidasa (7.45%), Pérdida de Audición y Sordera No-Sindrómica: Relacionada con GJB2 (4.36%), Deficiencia de Pseudocolinesterasa (3.93%), Síndrome de X Frágil (3.82%) y Fibrosis Quística (3.05%). En referencia a las enfermedades ligadas al cromosoma X, el 4.04% de las pacientes testadas resultaron portadoras de mutación ligada a este cromosoma, siendo portadoras de la Deficiencia de Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa (0.12%) y Distrofias Musculares Relacionadas con DMD (0.09%), además del Síndrome de X Frágil ya comentado.

En los 2948 matchings realizados, el 2.58% de los casos (76/2948) tenían alto riesgo reproductivo, destacando: 26 Síndrome de X Frágil, 20 Deficiencia de la Biotinidasa y 14 Pérdida de Audición y Sordera No-Sindrómica: Relacionada con GJB2. De los 76 matchings de alto riesgo reproductivo, 66 eran entre donante/receptor, 8 entre donante-donante y 2 entre parejas.

CONCLUSIONES

Para el test de portadores aplicado (análisis de hasta 314 enfermedades) casi la mitad de la población analizada es portadora de mutación/es. La aplicación del test de portadores en donantes, asociado al análisis de la pareja receptora y a un programa de matching, permite minimizar el riesgo residual de enfermedades genéticas en embriones de parejas que realicen un ciclo de reproducción asistida.

En el caso de un matching de alto riesgo donante/receptor o donante/donante se recomienda al centro de reproducción asistida responsable de la donación un cambio de donante. En el caso de un matching de alto riesgo en una pareja se recomienda la realización de un ciclo de FIV-DGP para reducir el riesgo de hijo afecto.

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-122: INDICADORES DE CALIDAD DEL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN: MANUAL DE BUENA PRÁCTICA CLÍNICA DE LA SEF VERSUS GRUPO DE INTERÉS DE CALIDAD DE ASEBIR

M. Iglesias Núñez (1), A. Clavero Gilabert (2), M.C. Gonzalvo López (2), M.L. López Regalado (2), J. Muñoz Ramírez (3), V. Badajoz Liébana (4), M.A. Vilches Ferrón (5), M. Ardoy Vilches (6), A. González Utor (7), J.A. Castilla Alcalá (8)
(1) Hospital Universitario Quirón Madrid, Pozuelo de Alarcón, Madrid, (2) Unidad de Reproducción Humana. UGC Laboratorio Clínico y UGC Obstetricia y Ginecología, HU Virgen de las Nieves, Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (IBS), Granada, (3) Instituto Madrileño de Fertilidad. Madrid, (4) Clínica Ginefiv. Madrid, (5) Complejo Hospitalario Torrecárdenas. Almería, (6) Hospital Universitario Gregorio Marañón. Madrid, (7) MasVida Reproducción. Sevilla, (8) Unidad de Reproducción Humana. UGC Laboratorio Clínico y UGC Obstetricia y Ginecología, HU Virgen de las Nieves, Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (IBS). CEIFER Biobanco. Granada

INTRODUCCIÓN

El establecimiento de indicadores de calidad ha pasado a ser fundamental para lograr la excelencia en el laboratorio de reproducción asistida (LRHA). Por esta razón, se han publicado en 2016 textos de referencia como el cuaderno de Indicadores de Calidad del Laboratorio de Embriología elaborado por el Grupo de Interés de Calidad de ASEBIR y más recientemente el Manual de Buena Práctica Clínica en Reproducción Asistida del Grupo de Interés de Ética y buenas prácticas de la SEF (MBP-SEF). Creemos útil analizar en profundidad los indicadores de estos dos documentos.

OBJETIVO

Comparar los indicadores de calidad del LRHA propuestos en los documentos de ASEBIR y MBP-SEF, para intentar facilitar la labor de los profesionales a la hora de utilizar los indicadores de calidad.

MATERIAL Y MÉTODO

Los indicadores de ASEBIR son 14, que desglosados por técnica resultan 43. Los indicadores del MBP-SEF relacionados con el laboratorio son 26, que desglosados por técnica son 54. A parte, el MBP-SEF describe 31 indicadores no relacionados con el laboratorio que no son objeto de análisis. Aunque en el MBP-SEF muchos indicadores, que podrían ser comunes a varias técnicas, son solo citados en una, se consideran aplicables a técnicas afines a efectos de este estudio. Los indicadores se clasificaron como: similares (presentes en ambos documentos y similar definición), discrepantes (presentes en ambos documentos pero definición discordantes) y únicos (sólo se describen en uno de los dos documentos). Y se dividen estos en indicadores de efectividad y seguridad.

RESULTADOS

Indicadores de efectividad: Ambos documentos incluyen tasa de fecundación normal y porcentaje de ovocitos degenerados post-ICSI. Describen el porcentaje de ciclos con fallo total de fecundación, situando el MBP-SEF en el numerador "0 fecundados" y ASEBIR "0 ovocitos con fecundación normal". La tasa de ovocitos con 3 pronúcleos sólo la contempla el MBP-SEF.

EL MBP-SEF describe como indicadores: gestación bioquímica, clínica, nacido, nacido vivo, nacido vivo sano o niño en casa. ASEBIR solo utiliza la de gestación clínica cuando hay presencia de saco embrionario. El denominador utilizado en MBP-SEF puede ser ciclo o transferencia y en ASEBIR solo transferencia. Sólo el MBP-SEF utiliza la tasa de aborto.

Son similares la tasa de implantación, nº de preembriones transferidos por embarazo y porcentaje de preembriones utilizados. El número de embriones transferidos se define de manera diferente: embriones transferidos por ciclo en el MBP-SEF y número medio preembriones por transferencia en ASEBIR.

En lo referente a la criopreservación, ambos utilizan la tasa de supervivencia de ovocitos y embriones. La de espermatozoides solo es descrita por ASEBIR. El MBP-SEF se decanta por el porcentaje de ciclos con congelación de embriones, y ASEBIR por el porcentaje de preembriones crioconservados del total de embriones. Además, utilizan terminología diferente (congelación en MBP-SEF o crioconservación en ASEBIR).

Las tasas de ovocitos maduros, división embrionaria, formación de blastocisto, ciclos sin transferencia, media de ovocitos recuperados por donante y ovocitos desvitrificados por ovocitos vitrificados (en ovocitos de donante) solo son incluidos en el MBP-SEF; sin embargo, ASEBIR incluye el porcentaje de supervivencia espermática tras descrioconservación y de recuperación de espermatozoides móviles.

Indicadores de Seguridad: Ambos documentos presentan la tasa de gestación múltiple, sin embargo el MBP-SEF desglosa en dobles, triples y grandes múltiples. La tasa de aborto solo es incluida en el MBP-SEF.

CONCLUSIONES

Existen grandes discrepancias entre los dos documentos analizados. Parece necesaria una estandarización de los indicadores de calidad del LRHA. Esta estandarización debería estar en línea con los documentos de calidad de entidades certificadoras nacionales.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-123: LAS CARACTERÍSTICAS INDIVIDUALES DE CADA PACIENTE INFLUYEN EN EL ÉXITO DE LA VITRIFICACIÓN OVOCITARIA

S. Corral Bermúdez, L. Vidal Juan, Z. González Rodríguez, M. Rodríguez Mazaira, M. Iglesias Núñez
Hospital Universitario Quirón Madrid, Pozuelo de Alarcón, Madrid

INTRODUCCIÓN

La implementación de la técnica de vitrificación ovocitaria de forma rutinaria en los laboratorios de FIV ha permitido no sólo la preservación de la fertilidad en mujeres con distinta indicación, sino también facilitar la planificación en los ciclos de donantes y receptoras. Sin embargo, aunque la técnica esté bien establecida en los protocolos de trabajo, podría haber diferencias individuales en cada paciente que influyan en la supervivencia de los ovocitos al desvitrificarlos.

OBJETIVO

Detectar si existen diferencias en el porcentaje de supervivencia ovocitaria tras la desvitrificación entre distintas donantes de ovocitos.

MATERIAL Y MÉTODO

Se evaluaron las donantes incluidas en nuestro programa de donación de ovocitos entre los años 2012 y 2016. Un total de 257 donantes de entre 18 y 34 años fueron objeto de este estudio. Se realizaron 670 punciones, en las que se obtuvieron 10291 ovocitos, de ellos 4900 fueron metafase II destinados a vitrificación. Todos los ovocitos se han vitrificado con el kit Cryotop de Vitrificación de Kitazato (Kitazato, Japón). Se estudiaron los porcentajes de supervivencia de los ovocitos desvitrificados individuales y globales (^{2}). En todos los casos las donantes siguieron un protocolo de estimulación corto con antagonistas.

RESULTADOS

Entre 2012 y 2016 la supervivencia global de los ovocitos vitrificados fue del 82% (3697 sobreviven / 4479 ovocitos desvitrificados). Se detectaron tres donantes en las que los porcentajes bajan de forma notable. Si no tenemos en cuenta los porcentajes obtenidos en estas tres donantes, la supervivencia global fue del 84%.

En estas tres donantes la supervivencia fue manifiestamente inferior a la media siendo éstas: 30% (18/60), 46% (26/57) y <1% (1/22), con diferencias estadísticamente significativas respecto a la supervivencia total ($p<0.001$). Sin embargo, ciclos en fresco de las mismas donantes han dado como resultado niños nacidos vivos y sanos.

La supervivencia ovocitaria de cada bióloga es homogénea, y los casos de vitrificación de las tres donantes con inferior tasa de supervivencia se realizaron indistintamente por las diferentes embriólogas del laboratorio obteniendo resultados semejantes.

Se observaron además otros 5 casos con malos resultados que no han sido incluidos por haberse realizado pocos ciclos y no tener número de ovocitos representativo.

CONCLUSIONES

Existen diferencias individuales en el comportamiento de los ovocitos en la vitrificación. Teniendo en cuenta que las donantes son mujeres jóvenes sin problemas reproductivos a priori, sería necesario establecer estudios en mayor profundidad que implicaran específicamente pacientes de reproducción e interesadas en preservación de fertilidad, con rangos de edad más amplios.

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-124: AFECTA LA REPETICIÓN DE CICLOS EN DONANTES A LA SUPERVIVENCIA DE LOS OVOCITOS VITRIFICADOS

J. A. Sánchez Rodríguez, E. Criado Scholz
FIVMARBELLA, Marbella, Málaga

INTRODUCCIÓN

La vitrificación de ovocitos ha supuesto un gran avance en el campo de la biología reproductiva, ofreciendo la posibilidad de posponer la fertilidad o almacenar los ovocitos para realizar una ICSI si por algún motivo no pudo realizarse el día de la punción folicular. Además, ha permitido la creación de bancos de ovocitos, pudiéndose programar así el ciclo de ICSI cuando la receptora presente endometrio receptivo, ahorrando las complicaciones de la sincronización entre donante y receptora cuando los tratamientos se realizan en fresco, y ofreciendo unas probabilidades de éxito en las que no se aprecian diferencias significativas con los tratamientos de ovocitos en fresco.

OBJETIVO

Valorar si las repetidas estimulaciones en donantes de ovocitos afectan la calidad de los ovocitos obtenidos en la punción folicular, mediante la supervivencia ovocitaria tras la desvitrificación de ovocitos. Además, se estudia la dosis de FSH administrada en cada grupo de estimulación, para valorar si el consumo varía al realizar más de un ciclo a las mismas donantes.

MATERIAL Y MÉTODO

Se analizaron un total de 113 estimulaciones, de 31 donantes diferentes sometidas a más de 4 ciclos de estimulación ovárica controlada, con un máximo de 6 estimulaciones. Para la vitrificación de los ovocitos se usaron los medios de KITAZATO, siguiendo su protocolo.

Además, calculamos el total de FSH administrada y tipo de estimulación. Posteriormente, con los resultados obtenidos, calculamos el número de ovocitos desvitrificados y número de ovocitos que sobreviven a la desvitrificación, así como el consumo de FSH medio.

RESULTADOS

Se estudia el porcentaje de supervivencia ovocitaria, calculado como el total de ovocitos que sobreviven a la desvitrificación entre los ovocitos desvitrificados. Los porcentajes obtenidos de supervevienvia ovocitaria se mantienen estables, a excepción del grupo 2, con un aumento respecto al resto y disminución en el grupo 6 (ST1: 78,42%; ST2: 88,24%; ST3: 77,36%; ST4: 77,88%; ST5: 72,80%; ST6: 60,66%). Al realizar un coeficiente de correlación, se obtiene una correlación muy positiva (0,992), obteniendo un ajuste muy elevado de los puntos a la recta de regresión.

Respecto a la dosis de FSH usada en cada ciclo de estimulación no se observan grandes diferencias entre los 5 primeros grupos, si es diferente en el 6, debido al bajo número de donantes que contiene ese grupo.

CONCLUSIONES

La desvitrificación de estos ovocitos se llevo a cabo en diferentes centro de reproducción asistida, esto conlleva una variabilidad entre centros que se subsana con el alto número de ovocitos desvitrificados.

Con los resultados obtenidos en este estudio podemos concluir que la tasa de supervivencia ovocitaria no se ve afectada durante las primeras 5 estimulaciones a las que se somete a una donante. Si que observamos una variación en los grupo de 6 estimulaciones, donde el menor número de estimulaciones, y por tanto de ovocitos desvitrificados es más bajo, por lo que esas diferencias puedan deberse a ese motivo.

La cantidad de FSH necesaria para completar el ciclo de estimulación de la donante tampoco se ve influenciado por el número de estimulaciones a las que se somete, por lo que podríamos decir que el número de ovocitos obtenidos por punción folicular depende más de factores propios de las mismas donantes que del número de estimulaciones a la que es sometida.

Serían necesarios realizar más estudios con un mayor número de estimulaciones, sobre todo en los últimos grupos, para comprobar si esa tendencia continúa en estos grupos o ya comienza a afectarse la supervivencia ovocitaria.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-125: AFECTA LA REPETICIÓN DE CICLOS EN DONANTES A LA SUPERVIVENCIA DE LOS OVOCITOS VITRIFICADOS

J. A. Sánchez Rodríguez, E. Criado Scholz
FIVMARBELLA, Marbella, Málaga

INTRODUCCIÓN

La vitrificación de ovocitos ha supuesto un gran avance en el campo de la biología reproductiva, ofreciendo la posibilidad de posponer la fertilidad o almacenar los ovocitos para realizar una ICSI si por algún motivo no pudo realizarse el día de la punción folicular. Además, ha permitido la creación de bancos de ovocitos, pudiéndose programar así el ciclo de ICSI cuando la receptora presente endometrio receptivo, ahorrando las complicaciones de la sincronización entre donante y receptora cuando los tratamientos se realizan en fresco, y ofreciendo unas probabilidades de éxito en las que no se aprecian diferencias significativas con los tratamientos de ovocitos en fresco.

OBJETIVO

Valorar si las repetidas estimulaciones en donantes de ovocitos afectan la calidad de los ovocitos obtenidos en la punción folicular, mediante la supervivencia ovocitaria tras la desvitrificación de ovocitos. Además, se estudia la dosis de FSH administrada en cada grupo de estimulación, para valorar si el consumo varía al realizar más de un ciclo a las mismas donantes.

MATERIAL Y MÉTODO

Se analizaron un total de 113 estimulaciones, de 31 donantes diferentes sometidas a más de 4 ciclos de estimulación ovárica controlada, con un máximo de 6 estimulaciones. Para la vitrificación de los ovocitos se usaron los medios de KITAZATO, siguiendo su protocolo.

Además, calculamos el total de FSH administrada y tipo de estimulación. Posteriormente, con los resultados obtenidos, calculamos el número de ovocitos desvitrificados y número de ovocitos que sobreviven a la desvitrificación, así como el consumo de FSH medio.

RESULTADOS

Se estudia el porcentaje de supervivencia ovocitaria, calculado como el total de ovocitos que sobreviven a la desvitrificación entre los ovocitos desvitrificados. Los porcentajes obtenidos de supervevienvia ovocitaria se mantienen estables, a excepción del grupo 2, con un aumento respecto al resto y disminución en el grupo 6 (ST1: 78,42%; ST2: 88,24%; ST3: 77,36%; ST4: 77,88%; ST5: 72,80%; ST6: 60,66%). Al realizar un coeficiente de correlación, se obtiene una correlación muy positiva (0,992), obteniendo un ajuste muy elevado de los puntos a la recta de regresión.

Respecto a la dosis de FSH usada en cada ciclo de estimulación no se observan grandes diferencias entre los 5 primeros grupos, si es diferente en el 6, debido al bajo número de donantes que contiene ese grupo.

CONCLUSIONES

La desvitrificación de estos ovocitos se llevo a cabo en diferentes centro de reproducción asistida, esto conlleva una variabilidad entre centros que se subsana con el alto número de ovocitos desvitrificados.

Con los resultados obtenidos en este estudio podemos concluir que la tasa de supervivencia ovocitaria no se ve afectada durante las primeras 5 estimulaciones a las que se somete a una donante. Si que observamos una variación en los grupo de 6 estimulaciones, donde el menor número de estimulaciones, y por tanto de ovocitos desvitrificados es más bajo, por lo que esas diferencias puedan deberse a ese motivo.

La cantidad de FSH necesaria para completar el ciclo de estimulación de la donante tampoco se ve influenciado por el número de estimulaciones a las que se somete, por lo que podríamos decir que el número de ovocitos obtenidos por punción folicular depende más de factores propios de las mismas donantes que del número de estimulaciones a la que es sometida.

Serían necesarios realizar más estudios con un mayor número de estimulaciones, sobre todo en los últimos grupos, para comprobar si esa tendencia continúa en estos grupos o ya comienza a afectarse la supervivencia ovocitaria.

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-126: IMPORTANCIA DE LOS FACTORES EPIGENÉTICOS EN LA ESPERMATOGÉNESIS: VARIANTE H3T

I. Carreño Pérez (1), L. Seco Blanco (1), R. Vázquez Agüero (1), J.P. Iglesias Rodríguez-Aguilar (1), B. Castro Martín (1), E. Cruz Cruz (1), A. Bermejo de la Calzada (1)
(1) MINIFIV, Madrid

INTRODUCCIÓN

Durante el periodo de la espermatogénesis se producen una serie de modificaciones que generan el patrón epigenético específico del espermatozoide. La expresión de la variante histónica H3t (cambio epigenético conocido como modificación histónica) en el testículo se relaciona con la reorganización de la cromatina y la entrada en espermatogénesis. Ésta y otras alteraciones epigenéticas (metilaciones del ADN, remodelación de la cromatina y/o regulación mediante ARNs no codificantes) durante la espermatogénesis podrían justificar parte de los casos de infertilidad clasificados como idiopáticos.

OBJETIVO

Revisión del estado actual de conocimiento sobre la variante histónica H3t, altamente expresada en el testículo y cuya presencia se relaciona con los fenómenos epigenéticos implicados en la reorganización de la cromatina y entrada en espermatogénesis.

MATERIAL Y MÉTODO

Revisión bibliográfica de la base de datos de PubMed desde el año 2010 hasta 2017.

RESULTADOS

La variante histónica H3t es una proteína de transición, altamente expresada en el testículo y cuyo homólogo en células somáticas es la histona H3.1.

Se ha visto que los nucleosomas en los que la H3t está presente son mucho más inestables, inestabilidad otorgada gracias a 2 residuos sólo presentes en H3t (Val111 y Met71).

Esta inestabilidad produce una interacción más laxa en el nucleosoma y consecuentemente genera una cromatina más abierta y accesible necesaria para que las células germinales inicien el camino hacia la espermatogénesis (Tachiwana et al.).

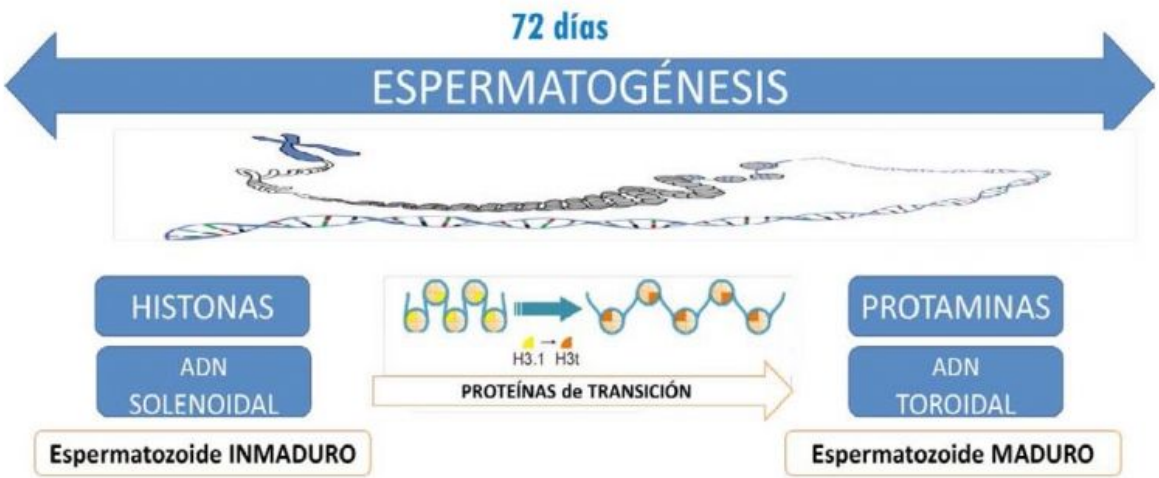
Se ha descrito que el grado en el que se produzca esta transición histona-protamina está relacionado con la capacidad fecundante del semen.

Estudios realizados en ratones han confirmado que la ausencia del gen H3t produce azoospermia. En ausencia de esta histona, no se generan células haploides durante la espermatogénesis.

Se cree que H3t funciona en etapas tempranas de la espermatogénesis y que su ausencia produce azoospermia al no producirse entrada en meiosis.

CONCLUSIONES

Los avances en el conocimiento de la epigenética espermática permiten proponer nuevos mecanismos que lleven a explicar las diferentes causas de infertilidad masculina. Entre estos mecanismos, la variante histónica H3t demuestra tener un papel fundamental de forma que alteraciones en su expresión se asocian a anomalías de la espermatogénesis. Dado que los mecanismos epigenéticos actúan a diferentes niveles, su conocimiento permitirá un mejor consejo genético y una mejora en las tasas de éxito en los tratamientos de reproducción asistida.



Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-127: COMPARACIÓN DE DOS IONÓFOROS DE CA2+ PARA ACTIVACIÓN OVOCITARIA ASISTIDA: MORFOCINÉTICA Y DESARROLLO

M. Durban LLenas (1), M. Martínez García (1), A. Rodríguez Aranda (1), J. Santaló Pedro (2), R. Vassena (1)
(1) Clínica EUGIN, (2) Universidad Autónoma de Barcelona

INTRODUCCIÓN

Desafortunadamente, el 1-3% de los ciclos de IVF experimentan un fallo completo de fecundación. En caso de ICSI, el fallo se debe a menudo a un factor masculino, por ejemplo una alteración funcional de factores activadores espermáticos. La activación ovocitaria asistida (AOA) puede restaurar la tasa de fecundación, re-estableciendo la vía bioquímica de movilización del Ca2+ intracelular y estimulando la abertura de los depósitos de Ca2+ en el retículo endoplasmático del ovocito, mediante el uso de un ionóforo del Ca2+ en el momento de la fecundación. No existe en la actualidad un consenso sobre qué protocolo de AOA asegura los mejores resultados de laboratorio y reproductivos, ni tampoco existen modelos en la especie humana para valorar la eficacia de distintas moléculas de Ca2+ ionóforo. La activación partenogenética permite mimetizar las fases de fecundación y desarrollo en el embrión humano temprano, sin utilizar espermatozoides o fecundación, y se presta entonces a ser utilizada en estudios de AOA.

OBJETIVO

Nuestro estudio compara la eficiencia de 2 protocolos de AOA utilizados en la práctica clínica, en el modelo partenogenético, y sus parámetros morfocinéticos, con el objetivo de identificar el protocolo más adecuado para el tratamiento de los fallos completos de fecundación.

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron ovocitos maduros (MII) donados a investigación que fueron activados partenogenéticamente mediante lavados secuenciales de los ovocitos en la solución del Ca2+ ionóforo del protocolo correspondiente. Según el ionóforo utilizado se definieron 2 grupos: Grupo A con A23187 (n=41 ovocitos) y Grupo I con Ionomicina (10 µmol/l; n=19). Los ovocitos de ambos grupos fueron microinyectados con una microesfera de látex, con el objetivo de proporcionar la misma manipulación y el mismo estimulo activador de una ICSI, seguido de lavados secuenciales en la solución de Ca2+ ionóforo correspondiente.

El cultivo de los partenotes se realizó en atmosfera de 5% O2. Su pseudodesarrollo fue registrado mediante dispositivos Time Lapse Primo Vision ® System, hasta el día 5 post activación. La diferencia entre grupos se analizó mediante la prueba Chi2 de Pearson.

RESULTADOS

La activación, evidenciada por la presencia de 1PN, fue significativamente superior en el grupo I, (11 de 19 ovocitos; 57,89%) versus el grupo A (2 de 41; 4,0%) ($p<0.001$).

En ambos grupos los tiempos de aparición y desaparición del pronúcleo fueron, para los grupos A e I, respectivamente: 6,61h (n=2) vs 11,9h (n=9) y 20,24h (n=1) vs 23,02h (n=10). En ambos grupos, aproximadamente la mitad de los ovocitos que se activaron llegó al estadio de 5 pseudoblastomeros (1 de 2 en A y 4 de 11 en I) en un tiempo medio similar: 45,18h para el grupo A y 51,17h para el grupo I.

Cabe destacar que ningún partenote del grupo A continuó sus divisiones celulares hasta el día 5, comparado con 2 de 11 (18.8%) de los del grupo I, que presentaban una morfología parecida al blastocisto en 121,9h.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados indican que la Ionomicina produce una activación ovocitaria más robusta que el A23187, sugiriendo su uso en AOA podría proporcionar mejores resultados clínicos que A23187. Por otro lado, concluimos que el modelo de activación partenogenética puede proporcionar datos relevantes en embriología clínica, mimetizando los tiempos de desarrollo de embriones humanos. Finalmente, los tiempos de desarrollo registrados en partenotes hasta t8 son comparables a los reportados en la literatura en embriones, sugiriendo que los tiempos de las primeras divisiones celulares embrionarias son independientes de la componente paterna.

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-128: ESTUDIO COMPARATIVO DE EMBARAZOS Y ABORTOS EN PACIENTES ANOVULADORAS Y OVULADORAS

E. Cano Oliva, A. Martín Pascual, Y. Paisano Felipe, L. Montoro Builes
Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Madrid.

INTRODUCCIÓN

La anovulación crónica explica el 30% de los casos de infertilidad. La organización mundial de la salud (OMS) divide los casos de anovulación en tres grupos. El grupo II constituye la disfunción hipotálamo-hipofisaria y en él se incluye el Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP) que afecta de un 5-10% de las mujeres en edad reproductiva y es responsable del 80% de los casos de infertilidad por anovulación. En estas pacientes se produce dificultad para conseguir el embarazo por sí mismas y en muchos casos recurren a la reproducción asistida para conseguir la gestación.

Durante la foliculogénesis se produce un reclutamiento inicial de folículos primordiales cuyo crecimiento se detiene en el estado temprano de folículos preantrales, se produce un aumento de GnRH, LH e insulina que estimula la teca ovárica y aumenta su producción de andrógenos.

El líquido folicular está formado por las secreciones de las células de la granulosa y de la teca y por difusión de proteínas plasmáticas a través de la membrana basal de los vasos de la teca. Este líquido es esencial para el crecimiento ovocitario ya que le confiere proteínas, esteroides, polisacáridos y metabolitos que modulan el crecimiento y la ovulación.

Se han observado cambios en la composición folicular en mujeres con SOP que se encuentran en tratamientos de estimulación ovárica al compararlas con pacientes en estimulación ovárica por otras causas (factor masculino principalmente).

OBJETIVO

Realización de estudio observacional retrospectivo del Hospital para verificar nuestra apreciación de peor calidad ovocitaria (según criterios ASEBIR) en las pacientes diagnosticadas de anovulación tipo II y tal y como avala la bibliografía, que estas pacientes puedan tener peores tasas de embarazo que otros subgrupos.

MATERIAL Y MÉTODO

Hemos estudiado una cohorte de 3.959 ciclos de pacientes con diferentes patologías y edades, divididas en dos subgrupos según diagnóstico: anovuladoras y resto de patologías, sin exclusión de factor masculino en ninguno de los dos subgrupos pero si de las pacientes con endometriosis y hidrosalpinx.

Estos dos grupos a su vez los dividimos en tres rangos de edades (≤34 años, 35-38 años y ≥38 años).

La prueba de contraste de hipótesis utilizada, con nuestra variable cualitativa (embarazo), fue chi- cuadrado.

RESULTADOS

Anovuladoras

Subgrupos de edades	Número de ciclos	Número de Embarazos	Número de Abortos
≤34 años	1332	372	58
35-38 años	1058	243	51
≥38 años	860	152	30

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

Resto de Patologías

SUBGRUPOS DE EDADES	NÚMERO DE CICLOS	NÚMERO DE EMBARAZOS	NÚMERO DE ABORTOS
≤34 años	340	107	16
35-38 años	234	66	15
≥38 años	135	37	8

Comparando los distintos subgrupos, no existen diferencias significativas entre los embarazos conseguidos en los subgrupos de ≤34 años y de 35 a 37 años. Tampoco se observan diferencias significativas al comparar abortos. Sin embargo, si existen diferencias significativas entre los subgrupos de mujeres ≥38 años, obteniendo una p=0.007.

CONCLUSIONES

Según nuestros resultados, la peor calidad ovocitaria apreciada en pacientes con Anovulación tipo II no afecta a las tasas de embarazo.

En el caso de existir diferencias en la composición del líquido folicular entre grupos, tampoco afecta a nuestras tasas de embarazo.

En pacientes mayores con Anovulación tipo II, no creemos que consigan mejores tasas de embarazo que el resto de pacientes. Las diferencias significativas observadas en este subgrupo podrían explicarse por las limitaciones del test (el tamaño muestral no sea el apropiado) o porque en el subgrupo de "otras patologías" ≥38años podemos encontrar diagnósticos con peor pronóstico al de las pacientes con Anovulación tipo II.

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-129: ICSI CON SEMEN TRATADO VS ICSI CON SEMEN SWIM-OUT

C. González Navas, E. Criado Scholz
FIV MARBELLA, Marbella, Málaga

INTRODUCCIÓN

La preparación del semen es una práctica habitual en los laboratorios de Reproducción Asistida. Numerosos estudios muestran una mejora en la calidad de los espermatozoides después de someterlos a técnicas como el gradiente de densidad recuperando espermatozoides con mejor motilidad y morfología. Además éstas técnicas son necesarias para separar los espermatozoides del plasma seminal permitiendo la capacitación espermática activándolos para fertilizar al ovocito maduro.

Una nueva técnica denominada Swim-out consiste en poner directamente la muestra de semen del paciente en PVP en la placa de ICSI sin someter la muestra a ningún tipo de tratamiento por lo que los espermatozoides son seleccionados directamente del eyaculado.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio es comparar si existen diferencias en porcentajes de fertilización, desarrollo y -hCG positivas microinyectando espermatozoides tratados con gradiente de densidad frente a espermatozoides swim-out.

MATERIAL Y MÉTODO

El estudio se realizó en 24 pacientes receptoras de ovocitos de donante y muestras de semen de pareja normozoospérmicas. Se microinyectaron 97 MII con semen tratado y 94 MII con semen swim-out.

Las muestras de semen fueron recogidas entre agosto de 2016 y marzo de 2017. A todas ellas se les analizó los parámetros básicos de volumen, concentración y motilidad.

Antes del tratamiento separamos un mínimo volumen de muestra en un tubo falcon de 5mL. El resto de las muestras de semen fueron preparadas usando Supra Sperm 100% (Origio Medicult) previamente diluido con SpermWashing (Sage) para conseguir una concentración de 40% y 80%.

Las columnas se prepararon en tubos Falcon de centrífuga usando una fracción de 2ml de gradiente al 80%, otra fracción de 2mL de gradiente al 40% y por último una fracción de 2 ml de muestra de semen. La columna fue centrifugada a 1600 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, el pellet fue lavado en 2ml de Sperm Washing (Sage) seguido de una centrifugación de1800 rpm durante 10 minutos. Por último se retiró todo el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 0,5 ml de medio Fert (Origio Medicult) previamente gasificado (6%CO2, 37ºC) 12 horas.

Se prepararon placas de ICSI (Falcon) con 2 líneas de PVP al 7% (SAGE). En una de las líneas en la parte superior se depositó una alícuota del semen capacitado y en la otra línea de PVP en la parte superior fue depositado el semen sin tratar.

La mitad de los ovocitos en metafase 2 de la donante fueron inyectados con espermatozoides que provenían de la muestra de semen tratada con el gradiente de densidad y la otra mitad se microinyectaron con los espermatozoides swim-out.

18 horas post-inseminación se valoró la correcta fecundación de los ovocitos (2 pronúcleos y 2 cuerpos polares).

Los zigotos fueron cultivados hasta la etapa de blastocisto en medio único (1-STEP, Origio Medicult). En día +5 fueron clasificados y seleccionados para su transferencia y/o congelación.

RESULTADOS

Nuestros resultados muestran que la tasa de fecundación no difiere usando tanto semen tratado como semen swim-out. Sin embargo, las tasas de blastulación y de -hCG positivas por transferencia, son más elevadas cuando usamos semen tratado con gradiente de densidad para realizar la microinyección de los ovocitos maduros.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

	Fecundación	Blastulación	b-hCG	Transferencias (N)
Tratado (N=97 MII)	77,3%	68,0%	70,0%	10
Swim-out (N=94 MII)	79,8%	54,7%	44,4%	9

CONCLUSIONES

Según nuestros resultados hay un descenso del porcentaje de bastulación y de embarazo (-hCG por transferencia) cuando utilizamos la técnica de swim-out.

Tratando las muestras de semen con gradientes de densidad estamos seleccionando espermatozoides con unas mejores características, mejor motilidad y morfología además de favorecer la capacitación espermática activando la reacción acrosómica que es fundamental para la fecundación de los ovocitos. Por tanto, parece recomendable tratar el semen que usaremos en la fertilización de los ovocitos para optimizar los resultados en los tratamientos de Fiv.

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-130: COMPARISON OF SPERM PROCESSING TECHNIQUES IN TERMS OF BLASTOCYST DEVELOPMENT IN A SIBLING OOCYTE SETTING

E. Yalcinkaya Kalyan (1), S. Can Celik (1), O. Okan (1), B. Duran (1), S. González Hidalgo (2)
(1) Adatip Hospital IVF Unit, Sakarya, Turkiye (2) Indegsal, León, Spain

INTRODUCTION

Semen processing is one of the most crucial steps during in vitro fertilization treatment. The main aim of these procedures is to eliminate abnormal spermatozoa and to select the best ones as much as possible during assisted reproduction techniques (ART) (1). There are two basic sperm preparation techniques that are currently and frequently used in IVF labs, including density gradient (DGC) and swim up techniques. There are many studies in the literature comparing both techniques in terms of their effects on sperm cells and ART outcomes (2,3,4).

OBJECTIVES

The aim of this study was to compare fertilization and blastocyst development rates between sibling oocytes that were fertilized with the spermatozoa prepared by either gradient or swim up technique.

MATERIAL AND METHODS

A total of 18 patients were included in the study. 147 mature oocytes were enrolled in group 1 (swim up) and 146 were enrolled in group 2 (gradient). Embryo development was followed until day 6. Total number of fertilized oocytes, blastocysts and top quality blastocysts were recorded. Groups were compared by non-parametric Mann-Whitney U test by using SPSS program in terms of fertilization rate, ratio of blastocyst development and blastocyst utilization rate.

RESULTS

Laboratory outcomes of both groups are given in the following table. No statistically significant differences were found between both groups in terms of all parameters ($p>0.05$ for each).

Table: Comparison of both groups in terms of laboratory outcomes

CONCLUSIONS

Our data show that ratio of blastocyst development in swim up group was higher compared to the DGC group whereas there was a higher blastocyst utilization rate in DGC group compared to swim up; meaning that DGC group may yield more number of blastocysts for transfer and cryopreservation. However; the differences were not statistically significant with these number of patients. These results seem valuable due to using sibling oocyte data; and needs to be strengthened bu using larger number of patients in further studies. The data which would be obtained from more participants would change our perspective for semen processing for ICSI and IUI.

BIBLIOGRAPHY

1. Henkel RR, Schill WB. Sperm preparation for art. Reprod Biol Endocrinol. 2003;1:108.

2. Fauzia Butt,Muhammad Arshad Chohan. Comparative efficacy of density gradient and swim-up methods of semen preparation in intrauterine insemination cycles. JPMA 2016; 66: 932.

3. Ricci G, Perticarari S, Boscolo R, Montico M, Guaschino S, Presani G. Semen preparation methods and sperm apoptosis: swim-up versus gradient-density centrifugation technique. Fertil Steril 2009; 91(2): 632-8.

4. XiaXue & Wan-ShanWang & Juan-ZiShi & Si-LinZhang & Wan-QiuZhao & Wen-HaoShi & Bao-Zhu Guo & ZhenQin. Efficacy of swim-up versus density gradient centrifugation in improving sperm deformity rate and DNA fragmentation index in semen samples from teratozoospermic patients. J Assist Reprod Genet (2014) 31:1161–1166.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-131: ANÁLISIS MORFOCINÉTICO DE EMBRIONES CULTIVADOS CON MEDIO ÚNICO G-TL® (VITROLIFE) EN UN INCUBADOR BENCH-TOP TIME-LAPSE (GERI®) EN CONDICIONES DE HIPOXIA CONTROLADA

V. Antequera Durán, E. Ferrer Robles, P. Muñoz Soriano, C. Catayud Lliso, M. Ruiz Jorro
CREA Medicina de la Reproducción, Valencia

INTRODUCCIÓN

La tecnología Time-lapse permite analizar los embriones durante todo su desarrollo sin tener que variar sus condiciones de cultivo. De esta forma, se consigue una gran cantidad de datos que podrían utilizarse para predecir su capacidad de implantación. De hecho, existen diferentes algoritmos de selección embrionaria que intentan conseguirlo,aunque es necesario tener en cuenta que estos trabajos se han realizado con muestras y condiciones de cultivo diferentes, y por tanto, estas condiciones pueden originar diferencias en el desarrollo embrionario1-3.

OBJETIVO

Determinar el perfil morfocinético de embriones humanos procedentes de ovocitos propios cultivados hasta el estadío de blastocisto con el medio único en un incubador Bench-top Time-lapse en condiciones de hipoxia controlada.

MATERIAL Y MÉTODO

El cultivo de 412 embriones procedentes de 84 ciclos de ICSI con ovocitos propios se realizó en un incubador Bench-Top Time-lapse (GERI®) a 37°C, 6,4% CO2 y 5% O2, con medio único G-TL® (Vitrolife). La edad media de las pacientes fue 36.3 ± 3.7 y se descartaron los ciclos con DGP.

Las imágenes de todos los embriones se tomaron cada 5 minutos en 11 planos focales diferentes. Los embriones se cultivaron hasta el estadio de blastocisto y se analizaron retrospectivamente para determinar los parámetros morfocinéticos siguientes: tiempo de desaparición de pronúcleos (PNf), de división celular, compactación y formación de blastocisto (t2, t3, t4, t5, t8, tM, tSB y tEB), tiempos correspondientes a los ciclos celulares (CC1 =t2-PNf, CC2 = t4-t2, CC3 = t8-t4) y los relacionados con la sincronía celular (S2 = t4-t3 y S3 = t8-t5). Se consideró como tiempo inicial el momento de la microinyección de los ovocitos.

RESULTADOS

Tras el análisis morfocinético de los embriones se determinaron las medias, desviaciones típicas y los intervalos de confianza (95%) de todos los parámetros anotadosy los valores obtenidos se muestran en la tabla 1.

CONCLUSIONES

Ladeterminacióndelperfilmorfocinético de los embriones cultivados con G-TL® y en el incubador GERI® en condiciones de hipoxia controlada se deben tener en cuenta para el diseño de un modelo de predicción de formación de blastocisto y de implantación puesto que las condiciones de cultivo afectan al desarrollo embrionario y por tanto, los parámetros morfocinéticos también pueden variar. Es por ello, que es necesario que cada laboratorio tenga en cuenta sus propias condiciones para el análisis de los embriones y para la determinación del embrión con mayor potencial de implantación.

La tecnología time-lapse es una herramienta útil para los embriólogospuesto que la observación continua de todo el desarrollo embrionario puede aportar una gran cantidad de información que se podría utilizarpara mejorar los resultados de los tratamientos de reproducción asistida.

Tabla 1

	Total			Blastocistos (N=205)		Blastocistos AB (N=168)	
Variable	N	Media ± DS	IC 95%	Media ± DS	IC 95%	Media ± DS	IC 95%
PNf	412	23.2 ± 3.9	22.8 - 23.6	22.0 ± 0.1	22.0 - 22.0	21.7 ± 0.1	21.7 - 21.8
t2	408	27.8 ± 6.6	25.1 - 30.5	25.5 ± 0.1	25.5 - 25.5	25.2 ± 0.1	25.2 - 25.2
t3	394	35.8 ± 7.5	35.1 - 36.6	34.6 ± 0.2	34.6 - 34.7	34.4 ± 0.2	34.4 - 34.5
t4	383	39.1 ± 8.5	38.2 - 39.9	36.5 ± 0.2	36.5 - 36.5	36.1 ± 0.2	36.1 - 36.1
t5	364	47.7 ± 9.8	46.7 - 48.7	46.6 ± 0.3	46.6 - 46.6	46.4 ± 0.3	46.3 - 46.4
t8	316	58.6 ± 10.9	57.1 - 60.1	57.5 ± 0.4	57.4 - 57.5	54.9 ± 0.3	54.8 - 54.9
tM	229	94.4 ± 11.6	92.9 - 95.9	93.0 ± 0.4	92.9 - 93.1	90.2 ± 0.3	90.2 - 90.3
tSB	209	102.2 ± 13.4	100.4 - 104.0	101.3 ± 0.5	101.2 - 101.4	99.6 ± 0.4	99.9 - 99.7
tEB	205	113.7 ± 12.1	112.0 - 115.5	113.4 ± 0.5	113.3 - 113.5	111.1 ± 0.4	111.1 - 111.2
CC1	408	4.6 ± 5.0	4.1 - 5.1	3.5 ± 1.8	3.3 - 3.7	3.5 ± 1.5	3.2 - 3.7
CC2	402	11.6 ± 5.7	11.0 - 12.2	11.0 ± 3.3	10.5 - 11.5	10.9 ± 3.0	10.4 - 11.3
CC3	316	21.3 ± 8.8	20.3 - 22.3	21.0 ± 8.7	19.8 - 22.2	18.8 ± 7.1	17.7 - 19.9
S2	383	3.6 ± 5.3	3.1 - 4.2	1.9 ± 2.6	1.5 - 2.3	1.7 ± 2.5	1.3 - 2.0
S3	315	11.9 ± 9.1	10.9 - 12.9.	10.8 ± 9.2	9.5 - 12.1	8.6 ± 8.1	7.4 - 9.8

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

BIBLIOGRAFÍA

1. Liu Y. Chapple V., Feenan.K., Roberts P. and Matson P. Time-lapse deselection model for human day 3 in vitro fertilization embryos: the combination of qualitative and quantitative measures of embryo growth. Fertility and Sterility® Vol. 105, No. 3, March 2016 0015-0282.

2. Motato Y., De los Santos M.J., Aparicio-Ruiz B.,RemohíJ.andMeseguer M. Morphokinetic analysis and embryonic prediction for blastocyst formation through an integrated time-lapse system. Fertility and Sterility® Vol. 105, No. 2, February 2016 0015-0282.

3. Bjørn Molt Petersen B.,MikkelBoel M., , Montag M., and Gardner D. Development of a generally applicable morphokinetic algorithmcapable of predicting the implantation potential of embryos transferred on Day 3.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-132: ANÁLISIS MORFOCINÉTICO DE EMBRIONES CULTIVADOS CON MEDIO ÚNICO G-TL® (VITROLIFE) EN UN INCUBADOR BENCH-TOP TIME-LAPSE (GERI®) EN CONDICIONES DE HIPOXIA CONTROLADA

L. Cascales Romero (1), J.A. Ortiz Salcedo (2), J. Ten Morro (1), A. Rodríguez Arnedo (1), J. Guerrero Villena (1), B. Lledó Bosch (2), J. Llácer Aparicio (1), R. Bernabeu Pérez (1)
(1) Instituto Bernabeu Madrid, (2) Instituto Bernabeu Biotech, Alicante.

INTRODUCCIÓN

La recuperación ovocitaria tras punción ovárica y la madurez nuclear de dichos ovocitos supone una de las primeras preocupaciones cuando da comienzo un ciclo de reproducción asistida. La influencia que el número de ovocitos recuperados y maduros tiene en el desarrollo posterior de los embriones ha sido tradicionalmente evaluado atendiendo a parámetros morfológicos hasta el día de la transferencia. Actualmente, la información que nos aporta el screening cromosómico completo (CCS), supone una herramienta muy valiosa que nos permite una valoración objetiva del estado de los embriones y, los factores que pueden influir en el resultado de dicha técnica, deben ser necesariamente analizados. Además, la evolución de las técnicas ha permitido conocer la existencia de embriones que presentan mosaicismos, los cuales son objeto de numerosos estudios y controversias y, por lo tanto, también de interés a la hora de conocer los factores que lo determinan. El objetivo final es llegar a disponer de embriones cromosómicamente normales con poder implantatorio, por lo que conocer si la eficiencia de la estimulación ovárica, evaluándola desde el punto de vista de la recuperación ovocitaria, presenta alguna repercusión sobre este objetivo es de suma importancia para un abordaje correcto y personalizado de cada uno de los ciclos.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es conocer si el número de ovocitos recuperados tras punción, el número de ovocitos maduros y la tasa de ovocito maduro, se relaciona con la presencia de aneuploidías y mosaicismos embrionarios.

MATERIAL Y MÉTODO

Recogimos los datos de los tratamientos de biopsia embrionaria desde febrero de 2013 a enero de 2017. El número de embriones analizado fue de 2.039 (875 de ovocito propio y 1.164 de donado) correspondientes a 736 ciclos. Se realizó un estudio de asociación mediante regresión logística binaria teniendo como factor de confusión la edad materna y el dia de la biopsia.

RESULTADOS

Las tasas de aneuploídias embrionarias se ven significativamente reducidas (p=0,013) al incrementar los ovocitos recuperados con un Odds Ratio (ODR) de 0.979 (IC 95%: 0.963-0.996). También se reduce la tasa de aneuplodías al aumentar los ovocitos maduros (p=0,01, ODR 0,974 e IC95%: 0,954-0,994). Según el origen ovocitario, en ciclos de ovocito propio las aneuploidias decrecen al aumentar el número de ovocitos y de ovocitos maduros (p=0,049 ODR 0,982 e IC95%: 0,964-0,99 y p=0,048 ODR 0,982 e IC95%: 0,96-0,985 respectivamente). La tasa de ovocito maduro no presenta dicha asociación (p=0,649). En ovocito donado, el número de ovocitos recuperados, de ovocitos maduros y la tasa de ovocito maduro no se asocian con la tasa de aneuploidía (p=0,4, p=0,778 y p=0,151 respectivamente). Esta asociación tampoco se presenta entre mosaicismo y las variables estudiadas.

CONCLUSIONES

Conseguir un número adecuado de ovocitos en la punción ovárica así como una elevada madurez ovocitaria se presenta como un factor importante a la hora de disminuir las tasas de aneuploidías embrionarias y por tanto mejorar los resultados posteriores. Estas relaciones no se cumplen cuando estudiamos los casos de mosaicismo embrionario por lo que la aparición de este resultado no se ve influído por el número de ovocitos recuperados en la punción. Estos datos nos permiten tener información desde el momento de la obtención de los ovocitos de los posibles resultados tras CCS con lo que facilita el abordaje del ciclo y una transmisión de información más exhaustiva a los pacientes desde el inicio del mismo. De la misma forma, aporta información para el clínico a la hora de indicar la estimulación ovárica más apropiada.

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-133: PORCENTAJE DE ACEPTACIÓN DE DONANTES DE OOCITOS DURANTE EL PROCESO DE SELECCIÓN

B. Martínez Martínez, E. Criado Scholz, A. Yus Castan
FIV MARBELLA, Marbella, Málaga

INTRODUCCIÓN

Las mujeres que quieran someterse a un ciclo de donación de ovocitos, deben ser estudiadas teniendo en cuenta los requisitos que establece el Real Decreto-Ley 9/2014, que regula la donación de gametos en España. Aun así, existen algunos criterios de exclusión que pueden variar dependiendo de cada centro.

OBJETIVO

Identificar los principales motivos de rechazo entre las aspirantes a donantes de ovocitos y cuantificar el número de aspirantes que son excluidas a lo largo de las diferentes fases del proceso de selección.

MATERIAL Y MÉTODO

Los datos que se presentan a continuación proceden de un total de 921 aspirantes que vinieron a informarse sobre la donación de ovocitos durante la actividad del año 2016. Fueron aspirantes con distintas nacionalidades y con una edad entre 18 y 35 años.

Las aspirantes pasaron por las diferentes fases del proceso de selección. La primera es la visita informativa, donde se les explicará detalladamente en que consiste el proceso de donación, sus fases y todos los requisitos necesarios. La siguiente fase, si la aspirante decide seguir adelante, será realizar una revisión ginecológica donde el personal médico le realizará la anamnesis y una exploración física y ginecológica. Superados estos filtros, se realizarán una serie de analíticas, estudios genéticos y una evaluación psicológica.

RESULTADOS

Mediante un estudio estadístico descriptivo se ha observado que de 921 aspirantes a donantes de ovocitos, el 9.2% no quiere donar o necesita pensarlo tras la visita informativa, un 13.2% de las aspirantes no llega a finalizar el proceso de selección debido a la falta de pacientes receptoras que tengan fenotipos similares y un 41.6% son no aptas para la donación. Finalmente aquellas aspirantes que pasan todas las fases de selección y son consideradas como aptas suponen solo un 35.8% del total.

De las aspirantes consideradas como no aptas para la donación, son excluidas por motivo médico un total de 29.4%. De éstas, un 13% son excluidas por IMC, un 9.3% por antecedentes familiares, un 4% por padecer alguna enfermedad o tomar medicación incompatible con el proceso, y 3.2% por tener un bajo recuento folicular. Por otro lado, serán rechazadas un 4.9% por tener alguna alteración genética de las estudiadas, un 3.4% por motivo psicológico, un 3.3% por tener una edad mayor de 33 y un 0.4% por aún no haber mantenido relaciones sexuales.

CONCLUSIONES

El proceso de selección de donantes es muy estricto, tanto que finalmente sólo un 35.8% de las candidatas son aptas y llegan a completar el proceso de donación. Esto significa que para disponer de un buen programa de ovodonación es necesario invertir muchos recursos en la búsqueda y captación de donantes así como en equipo humano que les informe debidamente sobre el proceso.

Una vez más, queda reflejado la necesidad de crear un Registro Nacional de Donantes donde se unifiquen los criterios de exclusión entre los distintos centros de reproducción asistida tanto para llevar a cabo el proceso de donación de gametos como para tener un buen control de los ciclos realizados y el resultado de los mismos.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-134: LA CONGELACIÓN DE SEMEN EN CASA POR EL PROPIO PACIENTE NO DISMINUYE LA TASA DE SUPERVIVENCIA POST-CRIOPRESERVACIÓN

B. Freijomil Díaz, B. Pujal Bravo, A. Munuera Puigvert, M. Góngora Zenón, L. Echeverría Bel, S. Botia Castillo, E. Sánchez Cuartielles, A. García Faura, F. García José, M. López- Teijón
Institut Marquès, Barcelona

INTRODUCCIÓN

Son diversas las causas por las que se indica la congelación de semen con fines reproductivos. Pacientes oncológicos para preservar su fertilidad, pacientes que van a someterse a una vasectomía, pacientes con disfunciones sexuales que tengan problemas para la obtención de muestras de semen, o pacientes que no puedan estar presentes el día de la fecundación in vitro.

Los protocolos de congelación definidos por las casas comerciales de los medios crioprotectores, seguidos rigurosamente por los biólogos, son tan sencillos que seguramente podrían ser realizados por personas inexpertas obteniendo resultados similares. Hemos diseñado un protocolo simplificado de congelación de semen para ser realizado por los propios pacientes.

OBJETIVO

El objetivo principal de este estudio es valorar si existen diferencias en el porcentaje de movilidad progresiva espermática recuperada tras la criopreservación realizada por los biólogos en el laboratorio y la realizada por manos inexpertas con un nuevo protocolo de congelación adaptado. Los objetivos secundarios son comparar la morfología, vitalidad, fragmentación de ADN y crecimiento bacteriano entre las muestras de los dos grupos.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio prospectivo de muestras de semen de 41 voluntarios. La obtención de las muestras se realiza siguiendo las instrucciones proporcionadas para tal efecto en el Manual de laboratorio para el Examen y procesamiento del semen humano (OMS-2010).

En el laboratorio se mide el volumen, se realiza un recuento inicial y valoración de la movilidad de la muestra y se separa una alícuota de 0,5 ml. Seguidamente, se entrega el resto al varón junto con instrucciones por escrito para realizar el proceso de congelación. El nuevo método de congelación consiste en añadir lentamente una cantidad siempre fija de 2 ml de crioprotector a la muestra, no volumen dependiente, dejándola incubar a temperatura ambiente. Seguidamente se pasa la muestra a viales y se sumerge en vapores de nitrógeno líquido inferior a -160ºC overnight. En ambos grupos, muestras congeladas por biólogos y muestras congeladas por voluntarios, el medio crioprotector utilizado es el Test Yolk Buffer de Irvine y el tiempo de incubación de 10 minutos. La rampa de descenso de la temperatura en el grupo de congelación por biólogos en el laboratorio es de 30 minutos. Posteriormente se sumergen los viales directamente en nitrógeno líquido en ambos grupos. En el test post-descongelación en ambos grupos se realiza recuento espermático de la concentración y movilidad con cámara Maklery microscopio de contraste de fases. En 11 muestras se realiza tinción rápida con el kit Hemacolor de Merck y valoración de la morfología según criterios estrictos de Kruger y de la vitalidad que se evalúa mediante tinción eosina-nigrosina. En 9 muestras se realiza test de Fragmentación ADN por TUNEL y citometría de flujo. En las muestras descongeladas de ambos grupos tras 24 horas de incubación en medio, se evalúa la presencia de bacterias. Se utiliza el estadístico de Wilcoxon para mirar diferencias entre grupos.

RESULTADOS

No se observan diferencias significativas entre grupos en el porcentaje de movilidad progresiva recuperada tras la criopreservación; control 45,99 (2,2-119,9) vs prueba 44,52 (18,21-90,99). Tampoco se observan diferencias en la morfología ni la vitalidad. La tasa de fragmentación de ADN fue menor en el grupo de voluntarios, pero sin significación estadística. No se observó crecimiento bacteriano en ninguna muestra.

CONCLUSIONES

Los protocolos de congelación espermática de descenso de la temperatura en rampa lenta son sencillos de seguir en los laboratorios de Andrología. Incluso personas sin formación previa son capaces de seguirlos fuera del laboratorio obteniendo los mismos resultados. Este nuevo protocolo diseñado es válido para que los pacientes puedan congelar su propio semen en casa.

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-135: CONDICIONANTES PREANALITICOS Y ANALÍTICOS DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO EN EL CONTEXTO DEL ESTUDIO SEMINAL BÁSICO

A. Mata Vila, R. Gusta Clavell, D. Casanova, O. López Rodrigo, O. Martinez Passarell, A. García Giménez, L. Bassas Arnau
Fundacio Puigvert, Barcelona

INTRODUCCIÓN

La integridad del DNA espermático en semen nativo está modulada por variables (espermatogénesis, tránsito postesticular) y condiciones preanalíticas, que se reflejan en los resultados. Por otra parte, y debido a la conocida autocorrelación entre las variables seminales clásicas (VSC), la utilidad potencial del análisis de la fragmentación del DNA espermático (frDAN) puede ser mayor en los pacientes normozoospérmicos y con esterilidad de causa desconocida (ECD)

OBJETIVO

Los objetivos del presente estudio son 1) estudiar el efecto de las condiciones preanalíticas sobre la frDNA, 2) comprobar la relación entre las VSC y la frDNA, y la proporción de hombres con frDNA alterada cuando los parámetros seminales clásicos son normales.

MATERIAL Y MÉTODO

Se estudiaron retrospectivamente muestras seminales de pacientes evaluados por infertilidad conyugal masculina o de causa desconocida. Se realizó un análisis de 1295 determinaciones de frDNA en semen no tratado, mediante la técnica de SCD (Halosperm, Halotech, Madrid). Se realizó un seminograma citomorfológico en las mismas muestras, aplicando la metodología de la OMS (2010). Se calcularon coeficientes de correlación (Pearson) y diferencias entre cohortes mediante ANOVA, Kruskal Vallis y Chi-cuadrado.

RESULTADOS

El 33,4% de los pacientes mostraron normozoospermia, mientras que en el 13,4% se observaron desviaciones de tres o más VSC. La abstinencia sexual se correlacionó más con la frDNA ($R=0,246$; $p<0,001$) que las VSC, pero el tiempo desde la eyaculación hasta el análisis no influyó en la frDNA, en contraste con lo que ocurre en espermatozoides capacitados. Otros indicadores preanalíticos indirectos, como el volumen, pH y marcadores bioquímicos no mostraron relación significativa con la frDNA. La mayoría de las VSC se correlacionaron entre sí. La frDNA se correlacionó también con diversas VSC, especialmente con la vitalidad ($R=-0,599$; $p<0,001$). Sin embargo, el 10,3% de los pacientes con vitalidad normal, y el 10,9% de los normozoospérmicos, mostraron frDNA alterada.

CONCLUSIONES

1) Algunas condiciones preanalíticas, en especial la abstinencia sexual previa, influyen sobre los resultados de la frDNA en muestras seminales no tratadas. 2) La frDNA se correlaciona con diversos parámetros seminales, y principalmente con la vitalidad. 3) El 10% de los individuos con esterilidad de causa desconocida presentan valores anormales del DNA espermático, y constituyen la población diana que puede beneficiarse más de esta prueba complementaria.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-136: DESARROLLO DE UN CONJUNTO BÁSICO DE INDICADORES DE CALIDAD DE LA FASE PRETÉCNICA EN EL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA A PARTIR DE UN CONSENSO DE EXPERTOS

M. López Regalado (1), N. Ortiz Piñate (2), S. Zamora López (3), I. Molina González (4), M. Vilches Ferrón (5), M. Gómez Cuesta (6), M. Esbert Algam (7), F. Marina Rugero (8), J. Moreno García (9), J.A. Castilla Alcalá (3)
(1) Unidad de Reproducción Humana. UGC Laboratorio Clínico y UGC Obstetricia y Ginecología, HU Virgen de las Nieves, Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (IBS), Granada, Spain., (2) Instituto Europeo de Fertilidad. Madrid, (3) Ceifer Biobanco, (4) Hospital Universitario Río Hortega (HURH)., (5) Unidad de Reproducción Asistida. UGC Obstetricia_Ginecología. UGC Biotecnología. Complejo Hospitalario Torrecárdenas, (6) Clinica Dexeus, Barcelona, (7) IVI Barcelona, (8) CEFER, Barcelona, (9) UR Clínica Vistahermosa, Alicante

INTRODUCCIÓN

El laboratorio de reproducción humana asistida (LRHA) se ha caracterizado en el ámbito sanitario por promover la calidad de su producto introduciendo conceptos como "control de la calidad", "garantía de calidad", "gestión de la calidad" (UNE, 2013), lo que nos ha permitido junto con la definición de indicadores de calidad de la fase técnica, tener aceptablemente bien controlada esta fase. Si bien esto es así, no es menos cierto que nos hemos limitado a la esfera de indicadores técnicos de la calidad: tasa de implantación, tasas de supervivencia o de gestación. El nuevo entorno sanitario nos exige seguridad del paciente, es decir, ausencia de errores. Son en las fases extratécnicas (pre- y postécnica) donde suceden el mayor número de errores, y más concretamente en la fase pretécnica, ocurriendo además en ellas, los errores más críticos.

OBJETIVO

Definir un conjunto de indicadores de calidad que especifiquen la importancia de la fase pretécnica en el LRHA.

MATERIAL Y MÉTODO

En la fase pretécnica existen 7 actividades (solicitud, preparación del paciente, obtención, identificación, transporte, manipulación y conservación) en cada uno de los procesos (análisis de semen, IA, FIV, criotransferencia, biopsia testicular, vitrificación de ovocitos y congelación de semen). Con el fin de seleccionar aquellos indicadores esenciales para la medida de la calidad en la fase pretécnica en el LRHA se ha utilizado una técnica formal de consenso, cuyo objetivo es la síntesis de la opinión de los expertos. El presente estudio ha contado con un panel de 16 expertos implicados en la gestión de la calidad pretécnica en el LRHA. En dos vueltas, priorizaron un set de indicadores de calidad entre 104 indicadores elaborados, tras revisión de la literatura y utilizados en experiencias previas. Entre ambas vueltas se realizó una consulta amplia de opinión, sobre la relevancia y la factibilidad de los indicadores de calidad que pasaron a la segunda vuelta.

RESULTADOS

En ambas vueltas del estudio se obtuvo una tasa de respuesta del 100 % de los 16 expertos seleccionados. Los indicadores destacados por los expertos fueron un total de 30 indicadores clasificados según el tipo: genéricos (7), comunes (20) y específicos (3), otorgando a genéricos (indicadores que afectan a todos los procesos) y específicos (indicadores que afecta a un proceso determinado) los de mayor importancia. Los indicadores genéricos fueron los siguientes: Porcentaje de "Número de pacientes sin resultados serológicos de ETS/ número total de pacientes citados para el proceso ; Porcentaje de "Número de pacientes que no acuden al proceso/número total de pacientes citados para el proceso"; Porcentaje de "Número total de muestras incorrectamente identificadas/número total de muestras"; Porcentaje de "Número de muestras que no cumplen las condiciones establecidas de transporte/número total de muestras"; Porcentaje de "Número total de muestras preparadas en condiciones inadecuadas/número total de muestras preparadas"; Porcentaje de "Número total de muestras preparadas con material inadecuado y manipulación incorrecta/ número total de muestras preparadas". Los indicadores específicos fueron: Porcentaje de "Número de criotransferencias con embriones que no se encuentran almacenados en la ubicación establecida/ número total de criotransferencias programadas"; Porcentaje de "Número de criotransferencias con soportes de vitrificación dañados/número total de criotransferencias programadas"; Porcentaje de "Número de IA realizadas en tiempo inadecuado/número total de IA".

CONCLUSIONES

Este documento es el primer paso en el ámbito de la fase pretécnica del laboratorio de reproducción de la comisión de Calidad de ASEBIR. Creemos que especialmente los indicadores propuestos son una herramienta clave para favorecer factores que mejoren la seguridad del paciente, reducir aquellos factores de riego de aparición de errores y fallos latentes del sistema.

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-137: EVALUACIÓN DE LA POLÍTICA DE ARRASTRE EN CRIOTRANSFERENCIA

A. Moral Fernández, A. Clavero Gilabert, M.C. Gonzalvo López, L. Martínez Granados, H. Gutierrez Rodríguez, M. Navarrete Carmona, M. Canales Gijón, I. Rodríguez García, J. Fontes Jiménez, B. Romero Guadix
Unidad de Reproducción Humana. UGC Laboratorio Clínico y UGC Obstetricia y Ginecología, HU Virgen de las Nieves, Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (IBS), Granada, Spain.

INTRODUCCIÓN

Los criterios de selección de embriones en D+3 para crioconservación varia de un centro a otro, es posible que laboratorios con estrictos criterios de vitrificación estén descartando embriones competentes que otros centros vitrificarían. Ciertos estudios han demostrado que algunos embriones en estadio de células con baja calidad son capaces de implantar. En nuestro centro, con el propósito de buscar un equilibrio entre el descarte de embriones que pueden tener un potencial de implantación bajo y vitrificar embriones no viables, utilizamos una política de "arrastre" entendida como vitrificar en el mismo dispositivo un embrión de baja calidad (que no cumplen criterios de vitrificación) con otro de buena calidad (embriones tipo A-B según la clasificación de ASEBIR).

OBJETIVO

Comparar la tasa de parto de criotransferencia con "arrastre" (un embrión de buena calidad (A o B) con otro de baja o muy baja calidad) frente a la criotransferencia de solo un embrión de buena calidad.

MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó un estudio retrospectivo en el que se analizaron las criotransferencias de pacientes en los que se había vitrificado en el mismo dispositivo un embrión de buena calidad con otro de baja calidad (según la clasificación embrionaria de ASEBIR 2015) y se comparó la tasa de parto respecto a las pacientes a las que se les había vitrificado solo un embrión de buena calidad. Nuestros criterios de no vitrificación son los embriones que cumplen las siguientes condiciones: embriones que tienen una anomalía de grado D por tener un número de células >6 en D+2, tener un nulo o escaso aumento de células de D+2 a D+3, tener 3 células estadio no específico en D+2, tener >1 célula binucleada en D+2 y/o >2 células binucleadas en D+3, tener >50% de blastómeras vacuoladas en D+2 y/o D+3; y embriones con una combinación de 2 anomalías de grado C ya sea el número de células, estadio no específico en D+2 y/o D+3, > 25% de restos, 1 célula binucleada en D+2 y/o 1-2 células binucleadas en D+3, >50% de blastómeras vacuoladas en D+2 y/o D+3.

Se incluyeron 139 pacientes: 114 pacientes a las que se les vitrificó un solo embrión de buena calidad y se le transfirió y 25 pacientes a las que se realizó una criotransferencia con "arrastre". La estimación del potencial de dar niño sano de los "arrastrados" es el número de niños sanos en el grupo de criotransferencia de "arrastre" menos el número estimado considerando la tasa de niño sano del grupo control. El NNT, número de pacientes necesarios a tratar para obtener un embarazo de más en el grupo de "arrastre" que en el de no "arrastre", fue calculado.

RESULTADOS

La tasa de parto en el grupo de pacientes con criotransferencia con "arrastre" fue del 32% (Odd ratio 1,26; IC 0,49-3,2), y no se encontraron diferencia significativas con la tasa encontrada en el grupo de pacientes que cumplían los criterios de vitrificación que fue del 27%. La tasa de parto múltiple fue del 12'5% en el primer grupo frente al 0% del segundo. El potencial estimado de dar un niño sano de los embriones arrastrados fue del 8% (2 de 25). El NNT que se obtuvo fue de 21 pacientes. Sería necesario realizar 21 criotransferencias con arrastre para tener un parto más que si se realizara solo la criotransferencia de 1 embrión de buena calidad.

CONCLUSIONES

Dado que no encontramos un efecto deletéreo con la política de arrastre, consideramos que es una práctica útil para evitar el descarte de embriones con muy bajo potencial de implantación.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-138: LOGÍSTICA DEL BANCO DE OVOCITOS. ESTUDIO DEL TRANSPORTE Y LA VIABILIDAD DE LOS OVOCITOS CRIOPRESERVADOS POR UN MISMO CENTRO

C. González Navas, E. Criado Scholz
FIV MARBELLA, Marbella, Málaga

INTRODUCCIÓN

Para un banco de óvulos el transporte es uno de los puntos críticos a la hora de preservar en óptimas condiciones la viabilidad de estas células. El contenedor y tipo de transporte deben garantizar que los ovocitos vitrificados lleguen a su destino a la temperatura óptima para evitar mermar la viabilidad de las células.

Analizando los resultados en la supervivencia de los ovocitos desvitrificados de donante vimos grandes diferencias en la supervivencia entre centros españoles y extranjeros incluso cuando los ovocitos vitrificados procedían de la misma donante y de la misma estimulación. Los ovocitos fueron procesados y vitrificados en las mismas condiciones por los embriólogos de nuestro centro, por tanto, estas bajas tasas de supervivencia nos llevaron a sospechar que el transporte podría influir en la viabilidad de los ovocitos criopreservados.

Transportar ovocitos vitrificados de donante mediante sistema aéreo supone diferencias con el transporte terrestre dentro del territorio peninsular, como por ejemplo, que los ovocitos deben ir en un contenedor DRY-SHIPPER en vapores de nitrógeno y no en nitrógeno en forma líquida. Además, factores como la presión atmosférica son variables que podrían influir en la viabilidad de las células criopreservadas.

OBJETIVO

Demostrar que las condiciones en las que los ovocitos vitrificados se transportan vía aérea no influyen en la supervivencia de los mismos; ni los vapores de nitrógeno ni los cambios de presión atmosférica interfieren con las tasas de supervivencia y/o fertilización de los ovocitos transportados.

MATERIAL Y MÉTODO

Los ovocitos fueron recogidos en nuestro centro mediante punción ovárica. Se decumularon una hora y media después de la punción y se seleccionaron los ovocitos maduros que fueron vitrificados a las 2 horas de la punción ovárica según el protocolo de Kitazato.

Llenamos un contenedor Dry-Shipper de nitrógeno líquido durante 24h. Posteriormente, se vacía el exceso de nitrógeno líquido del contenedor. Los cryotops son introducidos en el Dry-shipper mediante un sistema que asegura que la cadena de frío no se vea alterada.

En el interior del contenedor habrá una sonda que registrará la temperatura durante todo el viaje generando una gráfica con el registro de temperatura que ha efectuado en el tiempo del transporte. El contenedor será enviado vía aérea mediante modalidad "Lab to Lab"sin pasar por rayos X, a cualquier destino y regresará del mismo modo. Una vez de vuelta, guardaremos los cryotops en nuestros bancos a la espera de ser desvitrificados para nuestras pacientes.

RESULTADOS

187 MII transportados por vía aérea, fueron desvitrificados; 178 sobrevivieron y 143 MII fecundaron correctamente. Los datos fueron comparados con los ovocitos desvitrificados en nuestro centro durante los años 2015 y 2016, los cuales no estuvieron sometidos a ningún tipo de transporte. Todos los procedimientos fueron realizados por los mismos embriólogos.

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

No se observaron diferencias en las tasas de supervivencia y fertilización entre los ovocitos que fueron transportados vía aérea modalidad "Lab to Lab" en contenedores "Dry-Shipper" y aquellos que permanecieron en nuestro centro sin ser transportados.

N = MII	Transportados (L2L aéreo)	No transportados
Desvitrificados	187	508
Sobreviven	178	468
Fertilizados	143	352

	% supervivencia	% fertilización
Transportados (L2L aéreo) N=187 MII	95,2%	80,3%
No transportados N= 508 MII	92,1%	75,2%

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que la supervivencia y fertilización no son inferiores cuando desvitrificamos ovocitos que han sido transportados por nuestro sistema de Lab to Lab aéreo. Por tanto, podemos concluir que el tipo de transporte y sus condiciones, no afectan ni a la supervivencia y ni a la fertilización de los ovocitos vitrificados de donante en nuestra clínica.

Las diferencias observadas en otros centros que reciben ovocitos por esta vía pueden ser debidas a otros factores como la manipulación a la hora de recibir los ovocitos, las condiciones del laboratorio, los protocolos de desvitrificación e incluso el entrenamiento de los embriólogos que realizan las técnicas.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-139: RESULTADOS EN CICLOS CON TRANSFERENCIAS DE BLASTOCISTOS DE CALIDAD SUBÓPTIMA

C. Luna Cañas (1), J.A. Guijarro (2), S. Cortes (1), E. Olaya (1), L. Ortega (1), P. López (1), R. Núñez (1), P. Caballero (1)
(1) Clínica Tambre, Madrid, (2) Hospital Universitario Cuenca, Cuenca

INTRODUCCIÓN

En ciclos de FIV/ICSI y de donación de embriones las tasas de gestación e implantación aumentan al realizar transferencias de blastocistos. A pesar del uso de medios de cultivo adecuados, y de un sistema idóneo que nos permita un desarrollo lo más óptimo posible de los embriones en nuestro laboratorio, no siempre es posible obtener blastocistos de buena calidad, y nos vemos obligados a transferir blastocistos de calidad subóptima. Nuestra clasificación se basa en la de L. Veeck (2003), en la que se evalúa la expansión, la masa celular interna y el trofoectodermo.

OBJETIVO

Evaluar los resultados de ciclos de cultivo largo de FIV/ICSI y de donación de embriones en los que se han transferido blastocistos de calidad media-baja.

MATERIAL Y MÉTODO

Se han analizado retrospectivamente ciclos de cultivo largo realizados entre Enero de 2015 y Junio de 2016, en los que se realizaron 147 transferencias en fresco de embrión único, 46 de ovocitos propios (31,3% IC95%:23,80-38,79%) y 101 con donación de ovocitos (68,7% IC95%:61,21-76,20%). La edad media global fue de 39,9 ±4,74 años.

RESULTADOS

Se obtuvieron 95 embarazos, con una tasa de gestación global del 64,63%.

En un 8,2 % de los ciclos se transfirieron blastocistos de media o baja calidad (n=12).

Al analizar de forma independiente las variables calidad embrionaria y tasa de embarazo no se encuentran diferencias entre el grupo de ciclos en los que se transfirieron blastocistos de media-baja calidad (75,0; IC95%:50,5-99,5%), y el grupo de los que se transfirieron blastocistos de buena calidad (63,7%, IC95%:55,59-71,82%) (p=0.433). Tampoco entre las tasas de embarazo de cada uno de los parámetros morfológicos estudiados (expansión, masa interna y trofoectodermo p=0,996; p=0,969 y p=0,840 respectivamente), como si los estudiamos en función del origen de los ovocitos (p>0,35).

Para evitar el posible sesgo producido por las variables, en el análisis multivariante igualamos las edades de las pacientes y el origen de los gametos, y así analizamos las diferentes tasas de embarazo en función de las características morfológicas.

En el análisis multivariante, el origen de los gametos y de la edad de la paciente se encuentran directamente relacionados con las tasas de embarazo, pese al escaso tamaño muestral, pero no ocurre lo mismo con la clasificación morfológica de los blastocistos.

A igualdad de edades y origen de los gametos los ovocitos de donante proporcionan una mayor tasa de embarazo (OR: 3,2; p=0,021) pero no ocurre lo mismo con las tasas de embarazo en función de la calidad morfológica de los blastocistos (OR: 1.82; p=0,410).

CONCLUSIONES

No se han encontrado diferencias entre las tasas de embarazo entre blastocistos de diferentes calidades, ni relacionándolas con las edades de las pacientes ni con el origen de los ovocitos (propios o donados). Sería conveniente ampliar el tamaño de la muestra, así como estudiar la evolución de los embarazos conseguidos con los blastocistos que no sean de óptima calidad.

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-140: ESTUDIO SOBRE LA APLICACIÓN DE LA TRIPLE SELECCIÓN ESPERMÁTICA Y SU ÉXITO EN OVODONACIÓN

B. Renilla Garcia, E. Criado Scholz
FIV MARBELLA, Marbella, Málaga

INTRODUCCIÓN

En los tratamientos de FIV, procesar el semen es una herramienta crucial a la hora de mejorar los resultados de un tratamiento. Hasta ahora las técnicas más utilizadas en todos los laboratorios son el Swim-up y los gradientes de densidad. En nuestra clínica, introducimos una triple selección de espermatozoides: Gradientes + columnas de anexina + PICSI

OBJETIVO

El objeto de este estudio es demostrar si existe diferencia en las tasas de fertilización, de blastulación y Embarazo (B-HCG positivas), utilizando la triple selección espermática, frente a los tratamientos donde se han utilizado técnicas convencionales.

MATERIAL Y MÉTODO

El estudio se realizó analizando ciclos de ovodonación con semen de pareja en fresco, realizando la triple selección sólo en aquellas muestras que permitían la ejecución de las diferentes técnicas de laboratorio.

Para realizar la triple selección espermática, sometemos la muestra de esperma a un gradiente de densidad discontinuo al 80% y 40%(SupraSperm 100%, SAGE), los espermatozoides obtenidos se pasan por la columna de anexina (MACs, Miltenyi Biotec) seleccionando los no apoptóticos y por último los espermatozoides recuperados, son seleccionados mediantes PICSI (SpermSlow, Origio) para seleccionar los espermatozoides maduros y no apoptoticos. En los tratamientos donde no aplicamos una triple selección de espermatozoides, las técnicas utilizadas para la recuperación espermática, fueron gradientes de densidad y lavados de aquellas muestras que debido a su mala calidad, no permitían la realización de ninguna otra técnica alternativa al lavado seminal para concentrar la muestra

La media de óvulos utilizada por cada tratamiento de ovodonación es de 8,85 ovocitos por receptora. La microinyección de los óvulos frescos se realiza a las 40h después del decapeptyl y se valora la fertilización a las 18h post-ICSI, valorando la correcta fecundación de los ovocitos en aquellos que presenta 2 pronúcleos y 2 corpúsculos polares.

Se realizó un cultivo prolongado de los embriones hasta D+5/D+6 en medio único (1-Step, Origio), donde se valoraron para su transferencia y/o vitrificación.

Las tasas fueron calculadas en función de los tratamientos realizados en 2015 y 2016.

RESULTADOS

Como podemos ver en los resultados, las tasas de fertilización, blastulación y B-HCG positivas no presentan diferencias significativas en las tasas de fecundación, pero si hay diferencias significativas tanto en la tasa de blastulación como en la tasa de B-HCG positiva, entre los diferentes tratamientos.

	N	%FECUNDACIÓN	% BLASTULACIÓN	% B-HCG POS
SIN TRIPLE SELECCIÓN	119	79,04%	67,82%	66,28%
CON TRIPLE SELECCIÓN	34	78,96%	61,89%	53,57%

CONCLUSIONES

En teoría, cuando realizamos la triple selección espermática garantizamos que esta combinación de técnicas, nos permite seleccionar aquel espermatozoide con las mejores características morfológicas, mótiles y moleculares tiene aunque según nuestro estudio hay diferencias entre las tasas de blastulación y B-HCG positiva estudiadas cuando hacemos la triple selección.

Tenemos que destacar que la diferencia de "n" entre los tratamientos puede ser concluyente a la hora de dar unos resultados más fiables por lo que seguiremos trabajando con el fin de aumentar la "n" de los tratamientos con triple selección y demostrar si verdaderamente las diferencias pueden ser significativas o no.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-141: ¿HAY QUE TRANSFERIR SIEMPRE EN BLASTOCISTO O HAY QUE CONFIAR EN QUE SABEMOS SELECCIONAR PACIENTES Y EMBRIONES EN D+3?

Y. Cabello Vives, C. Romero Játiva, E. López Gallego, C. Cámara García, D. Ordóñez Pérez
Hospital Ruber Juan Bravo QuironSalud, Madrid

INTRODUCCIÓN

Con los nuevos sistemas de cultivo, incubadores trigas, time-lapse, mejora de los medios de cultivo, transferencia selectiva de un embrión, muchos laboratorios adoptado la política de transferencia en estadio de blastocisto siempre, independientemente del tipo de paciente o su factor de esterilidad. Por otro lado, hay laboratorios que deciden el día de la transferencia embrionaria según el día de la semana que es, a pesar de que hay artículos que demuestran por ejemplo, que en D6 hay menor tasa de embarazo que en D5 y se había evitado la transferencia en ese día porque era domingo (Poulsen V et al, 2017), o también se ha hablado de que embriones en D3 que no llegan a D5 podrían haber dado embarazo si los hubiéramos transferido en ese día debido a efectos deletéreos exógenos (Ghosh J et al, 2017).

Las ventajas de la transferencia en estadio de blastocisto son la capacidad de selección de embriones con mayor potencial de implantación y por tanto mayor posibilidad de transferir solo uno evitando embarazos múltiples, la mayor sincronización del estadio embrionario y el endometrio, o que en el blastocisto ya se ha producido la activación completa del genoma embrionario. Como inconvenientes, hay mayor tasa de cancelación de la transferencia en D5 debido a embriones que no llegan al estadio de blastocisto y que nunca podremos saber si hubieran implantado de ser transferidos en D3, parece existir mayor incidencia de embarazos gemelares monozigóticos y haber diferencias en el sexo de los embriones, teniendo el sexo masculino mayor prevalencia en los embriones transferidos en D5 (Sotiroska V et al, 2015).

OBJETIVO

Determinar en qué pacientes podemos seguir obteniendo embarazo seleccionando embriones en D3 o bien, si se consigue mayor tasa de embarazo por transferencia en D5 independientemente del tipo de paciente o de la calidad embrionaria en D3.

MATERIAL Y MÉTODO

Se han revisado retrospectivamente las transferencias correspondientes a 190 ciclos de FIV/ICSI realizados en 2016, con ovocitos propios o donados y se han comparado las tasas de embarazo clínico obtenidas tanto en D3 como en D5 y en qué tipo de pacientes y por qué factores se ha decidido hacer la transferencia en un día u otro.

RESULTADOS

En embriones obtenidos a partir de ovocitos propios, se obtuvo una tasa de gestación del 65% en D3 vs 53% en D5 y de implantación del 40% vs 38% respectivamente; en ovocitos donados la tasa de gestación fue del 85% en D3 y 83% en D5 y la de implantación del 58% vs 70% en los diferentes estadios. La media de embriones transferidos fue de 1,6 por paciente y la tasa de cancelación de transferencia por ciclo del 13%. La decisión del día de la transferencia se tomó en función de la historia y ciclos previos, el número de ovocitos fecundados, la calidad embrionaria en D3, el nivel de ansiedad y factor de esterilidad de la paciente. Todos los embriones se cultivaron con baja concentración de O2, medio de cultivo único y sistema de time-lapse.

CONCLUSIONES

1. Puede haber mejores tasas de embarazo en D3 que en D5 si se seleccionan bien los casos en los que hay que transferir en D5, aunque probablemente las pacientes que logran embarazo en D3 también hubieran tenido blastocistos para transferir en D5 y tal vez logrado embarazo, aunque no se puede saber si los efectos deletéreos del ambiente hubieran podido afectar en el desarrollo y en la implantación de esos embriones.

2. No se debe transferir indiscriminadamente a todas las pacientes en estadio de blastocisto si el equipo de embriólogos tiene amplia experiencia en selección embrionaria y se tienen en cuenta la historia previa de la paciente.

BIBLIOGRAFÍA

Poulsen et al. Elective embryo transfers on Day 6 reduce implantation compared with transfers on Day 5. Hum Reprod. 2017 Apr 7:1-6. doi: 10.1093/humrep/dex059.

Ghosh J et al: Global DNA methylation levels are altered by modifiable clinical manipulations in assisted reproductive technologies. Clin Epigenetics. 2017 Feb 6;9:14. doi: 10.1186/s13148-017-0318-6. eCollection 2017.

Sotiroska V et al: The day of embryo transfer affects delivery rate, birth weights, female-to-male ratio, and monozygotic twin rate. Taiwan J Obstet Gynecol. 2015 Dec;54(6):716-21. doi: 10.1016/j.tjog.2015.06.011.

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-142: NUTRIENTES IMPLICADOS EN LA FERTILIDAD Y DESARROLLO FETAL

L. Seco Blanco, R. Vázquez Agüero, I. Carreño Pérez, J.P. Iglesias Rodríguez-Aguilar, A. Bermejo de la Calzada
MINIFIV, Madrid

INTRODUCCIÓN

El descenso de la fertilidad es uno de los principales problemas en la sociedad actual. Según datos de la SEF (Sociedad Española de Fertilidad) el 85% de la población general concibe en el primer año de relaciones sexuales regulares y en ausencia de medidas anticonceptivas. De las que no conciben el primer año, la mitad lo conseguirán en el segundo, con una probabilidad acumulativa del 93 %.

La imposibilidad de concebir es una de las grandes causas de estrés de la población y por ello se intenta identificar y estudiar todos los parámetros implicados en la concepción y nacimiento de un recién nacido sano.

Uno de los parámetros que está cobrando fuerza asociado a la fertilidad es una nutrición saludable. La federación internacional de ginecología y obstetricia (FIGO) define la buena nutrición como una dieta adecuada que proporciona todos los nutrientes esenciales en cantidades y proporciones adecuadas para cada uno de los estados, pre-concepción y/o embarazo.

Los nutrientes afectan a la evolución del embarazo ya que están implicados en el metabolismo materno, paterno y fetal, regulando la actividad de enzimas, señales de transducción, rutas de transcripción y estrés oxidativo.

OBJETIVO

Revisión de literatura científica centrada en la relación gen-nutriente en las etapas periconcepcionales y gestacional, así como su impacto sobre la fertilidad, gestación y el desarrollo fetal.

Definición de los micronutrientes con impacto en el periodo peri-concepcional y gestacional.

Material y Método:

Revisión de bases de datos específicas de literatura científica (PubMed, Biblioteca universitaria, Researchgate) de artículos relacionados con la implicación de los nutrientes y una dieta saludable en la fertilidad y desarrollo fetal.

RESULTADOS

Aunque los estudios son aún escasos, admiten pruebas concluyentes sobre la implicación del folato en el desarrollo de defectos en el tubo neural. Así como el incremento en la ingesta de calcio y magnesio podrían reducir las anomalías hipertensivas inducidas por el embarazo (preeclampsia y eclampsia).

Micronutrientes como el hierro, el folato y el zinc están involucrados en calidad ovocitaria, maduración, ovulación y ciclo menstrual. Los compuestos intermedios y que forman parte del ciclo del carbono como metionina, homocisteína ácido fólico se relacionan con peores resultados en ciclos de reproducción asistida, con un menor número de óvulos recuperados y peor calidad de los mismos. Estos compuestos son los dadores de grupos metilo por excelencia, por lo que su deficiencia o exceso pueden llegar, incluso, a modificar las marcas de metilación del ADN fetal.

El seguimiento de dietas bajas en proteínas en las madres se relaciona con un menor número de células de la masa celular interna en blastocitos debido a la escasez de aminoácidos esenciales lo que conlleva una restricción de crecimiento del embrión temprano. Dietas poco equilibradas (por ejemplo, con un aporte excesivo de grasas) suelen conllevar una cantidad diaria de nutrientes por debajo de los valores recomendados. Una alimentación con una dieta rica en grasas resulta en una acumulación de lípidos y elevados niveles de apoptosis dentro del ovario y células del cúmulo ovocitario, reduciendo las tasas de fecundación y aumentando la producción de radicales libres de oxígeno en las mitocondrias de los blastocitos.

CONCLUSIONES

Aunque los estudios aún son escasos, nos muestran en resumen un rol importante de los nutrientes en el periodo periconcepcional, concluyendo que la fertilidad, concepción, implantación, formación de la placenta y desarrollo fetal son estadíos afectados potencialmente por la nutrición de los padres.

Por lo tanto, una ingesta materna adecuada de hierro, yodo, calcio, ácido fólico, así como un equilibrio nutricional durante la gestación puede aumentar las probabilidades de un desarrollo óptimo del embarazo.

Se recomienda un control y seguimiento de una nutrición saludable para optimizar la fertilidad y los resultados en técnicas de reproducción asistida.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-143: ¿VALE LA PENA REALIZAR UN TERCER INTENTO DE FIV-ICSI?

L. Andrés Criado, M. Morales Morales, E. Ricciarelli, J. Cuadros Fernández
Clínica FIVMadrid, Madrid

Introducción:
La probabilidad de embarazo en un primer intento de FIV-ICSI, tanto en las pacientes con oocitos propios como en las receptoras de oocitos, depende de diversos factores y oscila en un rango del 35% al 60%, según los casos. Sin embargo, las pacientes que no quedan embarazadas en este primer intento suelen insistir una segunda vez, e inclusive una tercera. Nos preguntamos si esa insistencia realmente se ve recompensada con una probabilidad acumulada alta de conseguir la gestación deseada.

OBJETIVO

Calcular las tasas de gestación clínica acumuladas hasta un tercer intento de FIV-ICSI en pacientes con oocitos propios y en receptoras. Comparamos, además, los resultados en estos dos grupos para conocer las diferencias entre estas tasas acumuladas.

MATERIAL Y MÉTODO

De enero de 2014 a diciembre de 2016, 365 pacientes con oocitos propios realizaron un primer intento de FIV-ICSI, 87 de las que no quedaron embarazadas en el primer intento lo hicieron una segunda vez, y 18 una tercera. Durante el mismo periodo, 333 receptoras de oocitos realizaron un primer intento de FIV-ICSI, 47 de las que no quedaron embarazadas lo intentaron una segunda vez, y 9 una tercera. Se calculó la probabilidad de embarazo acumulada en el segundo y en el tercer intento, en ambos grupos. Las probabilidades acumuladas de los grupos de oocitos propios y receptoras se compararon mediante el test del Chi-cuadrado.

RESULTADOS

En las pacientes con oocitos propios, las tasas de embarazo clínico en los intentos primero, segundo y tercero fueron del 37,0% (135/365), 42,5% (37/87) y 22,2% (4/18), respectivamente. La probabilidad acumulada en oocitos propios al segundo intento fue de 77,5% (172/222), y al tercer intento de 92,6% (176/190). En las receptoras de oocitos, las tasas de embarazo clínico en los intentos primero, segundo y tercero fueron del 49,5% (165/333), 44,7% (21/47) y 33,3% (3/9), respectivamente. La probabilidad acumulada en las receptoras de oocitos al segundo intento fue de 87,7% (186/212), y al tercer intento de 96,9% (189/195). El análisis estadístico muestra que tanto en el primer intento como en el acumulado al segundo intento, los resultados en receptoras de oocitos son significativamente mayores que en oocitos propios (p

CONCLUSIONES

Los resultados muestran que tanto las pacientes con oocitos propios como las receptoras de oocitos alcanzan tasas acumuladas de embarazo clínico altas cuando persisten al menos hasta un tercer intento de FIV-ICSI. Las tasas de embarazo clínico acumuladas en un tercer intento en estos dos grupos son estadísticamente similares.

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-144: ¿CUÁNDO Y CÓMO ASESORAR A NUESTROS PACIENTES SOBRE DGP?

C. Giménez Sevilla, E. Toro Toro, E. Garcia Guixé, M. Sandalinas Alabert
Reprogenetics, Barcelona

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico genético preimplantación (DGP), permite la detección de anomalías genéticas en el embrión antes de su transferencia al útero materno. Para ello, es necesario combinar técnicas de micromanipulación y técnicas moleculares que permiten valorar la presencia/ausencia de variantes génicas o desequilibrios cromosómicos.

Tanto las variantes cromosómicas (estructurales o numéricas), como las génicas, presentan un riesgo de recurrencia que catalogan a los pacientes como parejas con riesgo de descendencia afecta. El DGP es una opción, puede haber otras, para estas familias. Pero ¿qué información les facilitamos?

OBJETIVOS

Reflexionar sobre cuando y como ofrecer un asesoramiento genético a los pacientes que se someten a DGP.

MATERIAL Y MÉTODOS

Casos de DGP para la detección de enfermedades genéticas o anomalías cromosómicas estructurales.

RESULTADOS

Se obtienen resultados de los estudios previos (tamaños de los fragmentos en una translocación, tasas de ADO, ...) así como de la experiencia clínica acumulada, que permiten ofrecer a los pacientes una base sobre la que poder realizar el asesoramiento genético.

CONCLUSIONES

Cabe resaltar que, según el artículo 55 de la Ley 14/2007 de investigación biomédica, "cuando se lleve a cabo un análisis genético con fines sanitarios será preciso garantizar al interesado un asesoramiento genético apropiado" (sic). Por tanto, todo proceso de fecundación in vitro (FIV) que tenga por indicación realizar un DGP (cromosómico o génico) requiere que los pacientes reciban un asesoramiento genético.

El proceso de asesoramiento genético consta de dos fases, la pre-test y la post-test. Durante el asesoramiento pre-test, entre otros aspectos, deberemos ayudar a comprender los hechos médicos (incluyendo el diagnóstico, la evolución probable de la enfermedad y el manejo disponible, si fuera necesario), a entender la forma de herencia y el riesgo de recurrencia, a entender las alternativas para hacer frente al riesgo de recurrencia, y a elegir el curso de acción que les parezca más apropiado teniendo en consideración su riesgo, sus metas como familia, y sus normas éticas y religiosas, para que actúen de conformidad con esa decisión. También será necesario explicar los beneficios, los riesgos y las limitaciones de la técnica a utilizar durante el DGP, así como los posibles resultados esperados, incluyendo la posibilidad de que no haya ningún embrión para transferir o si lo hay que presente una menor fiabilidad o cierto riesgo. En el caso que el DGP requiera algún estudio previo (lo que clásicamente conocemos como estudio de informatividad), deberemos explicar los resultados obtenidos y sus implicaciones, antes que la pareja inicie el tratamiento de FIV.

En el asesoramiento post-test, en este caso post DGP y antes de la transferencia, debemos explicar qué resultados se han obtenido y si hay o no transferencia y por qué. En el caso de que haya transferencia, deberemos corroborar que los pacientes han entendido qué significa un embrión sano, o portador, o euploide, evitando la sensación de falsa tranquilidad y especificando qué es lo que hemos detectado y lo que no. Un embrión diagnosticado por DGP como transferible no tiene por qué significar un niño completamente sano y normal. Si el asesoramiento pre-test ha sido adecuado, esta explicación y el entendimiento de los resultados obtenidos debería ser muy sencilla. En aquellos pacientes en los que vayamos a realizar transferencia, deberemos también explicar los riesgos y beneficios así como las limitaciones del diagnóstico prenatal y las actuaciones que pueden emprender en función del resultado que se obtenga. En aquellos en los que no se haya obtenido embriones aptos para la transferencia, deberemos plantear la posibilidad de repetir ciclo y, en ese caso, si lo haremos igual o cambiaremos alguna pauta del tratamiento, o si buscamos alguna otra alternativa al DGP.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-145: VITRIFICACIÓN DE EMBRIONES EN ESTADIO DE MÓRULA EN CRYOTOP

M. Díaz Núñez, R. Mendoza Hourtouat, M.V. Aparicio Prieto, A. Expósito Navarro, M. Iglesias Calabria, M. Díez Zapirain, R. Matorras Weinig
Hospital Universitario Cruces, Barakaldo, Vizcaya

INTRODUCCIÓN

La vitrificación de ovocitos, embriones en estadio de 8 células (día +3) y blastocistos (día +5/+6) utilizando el método Cryotop de Kitazato ha demostrado ser una técnica segura y con la que se obtienen excelentes resultados tras la desvitrificación. La vitrificación con este método en estadio de mórula (día +4) no ha sido estudiada hasta la fecha a pesar de que podría suponer ventajas sustanciales al compararla con la vitrificación de embriones en día +3 y +5/+6. Al vitrificar sólo aquellos embriones que han sido capaces de sobrepasar el estadio crítico de 8 células por haber activado su genoma y haber alcanzado el estadio de mórula, habremos seleccionado los embriones con un potencial real de desarrollo a blastocisto y de implantación y habremos reducido el número de embriones almacenados que poseen bajo potencial de desarrollo posterior. Por otro lado, la ventaja que presentan las mórulas sobre los blastocistos expandidos es la ausencia de blastocele, lo que reduce el riesgo de formación de cristales de hielo durante el proceso de vitrificación, además de acortar el tiempo de cultivo previo a la vitrificación.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo era estudiar los resultados obtenidos con la vitrificación de embriones en estadio de mórula (día +4) utilizando el método cryotop de Kitazato.

MATERIAL Y MÉTODO

Los embriones no transferidos en ciclos de FIV/ICSI se dejaron en cultivo vitrificándose en día +4 en estadio de mórula. Los embriones se desvitrificaron y se mantuvieron en cultivo 20-24 horas para valorar su supervivencia y su capacidad evolutiva. Se transfirieron aquellos embriones que habían alcanzado el estadio de blastocisto. Se desvitrificaron 648 mórulas de 349 pacientes (1.8 ± 0.8) entre enero de 2013 y abril de 2017.

RESULTADOS

La tasa de supervivencia embrionaria fue del 77.3% y el 93.1% de las pacientes tuvieron transferencia. Las tasas de embarazo e implantación fueron de 33.3% y 20.35%, respectivamente.

Los resultados son comparables a los obtenidos vitrificando en estadio de blastocisto (tasa de embarazo 32.6% y tasa de implantación 22.5%.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren que la vitrificación con cryotop es un método efectivo y seguro para la criopreservación de embriones humanos en estadio de mórula.

BIBLIOGRAFÍA

1- Cobo A, De Los Santos MJ, Castell_o D, G_amiz P, Campos P, Remohi J. Outcomes of vitrified early cleavage-stage and blastocyst-stage embryos in a cryopreservation program: evaluation of 3,150 warming cycles. Fertil Steril 2012;98:1138–46.

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-146: TASA DE LLEGADA A BLASTOCISTO DE EMBRIONES DAÑADOS TRAS LA VITRIFICACIÓN

M. Lastra Salazar, P. Piqueras Trilles, M. Hebles Duvisón, L. Aguilera Duvisón, M. Guijarro Notario, J.M. Moreno Moya, B. Sánchez Ruiz, M. Martínez Saez, F. Sánchez Martín, P. Sánchez Martín
Ginemed Sevilla

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la criopreservación embrionaria se ha convertido en un proceso rutinario en la actividad diaria de las clínicas de reproducción. Nos ofrece diversas ventajas como la posibilidad de diferir el ciclo frente a una posible hiperestimulación ovárica. Permite evitar la transferencia de más de un embrión minimizando así riesgos de embarazo múltiple. Y por último nos da la libertar de poder diferir ciclo para evitar un endometrio más alterado debido a la estimulación.

Además con el afán en la búsqueda de transferencia de embrión único, ante cohortes embrionarias grandes se plantea el cultivo a estadio de blastocisto. Es un cultivo más agresivo que nos permite quedarnos con los embriones más resistentes y con un potencial de implantación mayor.

Las técnicas de criopreservación están muy depuradas, no obstante en alguna ocasión podemos obtener embriones con uno o más blastómeras lisadas (degeneradas o muertas). El potencial de desarrollo de estos embriones para llegar a estadio de blasto podría verse comprometido al no tener una supervivencia del 100%.

OBJETIVO

Evaluar la tasa de llegada a blastocisto de embriones post thawing con una o más blastómera lisadas.

MATERIAL Y MÉTODO

Realizamos un análisis retrospectivo de un total de 284 embriones vitrificados en día tres de evolución en ciclos diferidos segundo ciclo de la paciente (primer ciclo de vitrificados). Los embriones eran de entre seis y ocho células y una tasa de fragmentación variable entre $\leq$ 10% - 25%.

El protocolo que seguido de vitrificación fue con un sistema cerrado (Safespeed) y el protocolo que se siguió fue el siguiente: el embrión se pone en el medio de equilibrado entre nueve y diez minutos hasta que se re-expande. Posteriormente se pone en un medio de vitrificación durante un minuto hasta cargar el soporte, sellarlo e introducirlo en el nitrógeno líquido para almacenarse.

En cuanto al protocolo de thawing, los pasos a seguidos fueron; un minuto en un medio rico en sacarosa para expulsar todo el crioprotector y posteriormente se pone en un medio también recompuso con sacarosa pero a menor concentración para acabar de expulsar el crioprotector y finalemente se rehidrataran en medio de lavado (IrvineScientific).

RESULTADOS

El porcentaje de llegada a estadio de blastocisto con embriones que poseían una o dos blastómera lisada (9%) era notablemente menor respecto a los embriones intactos (77%). Estamos a la espera de saber los datos de embarazo de ese 9% de embriones con blastómeras lisadas que llegaron a estadio de blastocisto.

CONCLUSIONES

El potencial de desarrollo del embrión se ve sesgado cuando son parcialmente dañados en la vitrificación. La tasa de llegado a blasto no es comparable entre embriones que poseen una o más blastómeras lisadas frente a embriones intactos. No obstante consideramos que sería conveniente aumentar a N y hacer la comparativa con la tasa de implantación/gestación.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-147: ¿AFECTA EL TIPO DE MEDIO DE CULTIVO A LOS RESULTADOS DE LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA? ESTUDIO RETROSPECTIVO DE COHORTES EN CICLOS DE DONACIÓN DE OVOCITOS

M. Jiménez Blasco, V. Mon Agudo, M. Florensa Bargalló, M. Esbert Algam
IVI Barcelona, Barcelona

INTRODUCCIÓN

Son muchos los factores que pueden afectar a la calidad embrionaria y a los resultados de las Técnicas de Reproducción Asistida en los laboratorios de FIV, siendo uno de los principales el tipo de medio utilizado para el cultivo de gametos y preembriones: secuencial o universal. Los secuenciales requieren el cambio de medio del preembrión en D+3 y se desarrollan según la convicción de que éste presenta distintos requerimientos nutricionales y energéticos en las distintas fases del desarrollo preimplantacional. Los medios universales no requieren este cambio y se basan en la defensa de que los preembriones son capaces de seleccionar de su entorno aquellos nutrientes que necesitan en cada fase. Aunque se han realizado numerosos estudios con el fin de evaluar cuál es el mejor medio para el cultivo prolongado de preembriones, no existe un consenso en la literatura.

OBJETIVO

Comparar la calidad embrionaria y los resultados clínicos obtenidos en pacientes cuyos preembriones han sido cultivados en medio secuencial respecto a los que lo han hecho en medio universal.

MATERIAL Y MÉTODO

Se ha realizado un estudio retrospectivo observacional unicéntrico de cohortes en pacientes que se sometieron a un ciclo de donación de ovocitos entre abril y diciembre de 2015 en nuestro centro; de abril a agosto los preembriones fueron cultivados en el medio comercial secuencial Cook® IVF; de setiembre a diciembre se cultivaron en medio comercial universal Global® de IVFonline. Los criterios de inclusión fueron: ciclos de ovodonación con inseminación mediante ICSI con espermatozoides eyaculados y con transferencia en D+5 de desarrollo. Fueron excluidos los ciclos que incluían Diagnóstico Genético Pre-implantacional.

RESULTADOS

Los resultados se resumen en la siguiente tabla, donde se especifican los test estadísticos aplicados en cada caso:

	UNIVERSAL	SECUENCIAL	P-VALOR
Nº Pacientes	433	439	
Nº ovocitos	6296	6420	
Nº ovocitos inseminados	5428	5500	
Tasa ovocitos inseminados (%)*	91.4	92.2	N.S
Tasa fecundación (%)*	79.3	76.7	0.01*
Tasa blastocito (%)*	60.8	60.9	N.S
Tasa blastocito buena calidad (transferidos + vitrificados) (%)*	43.0	41.6	N.S
Tasa blastocitos vitrificados (%)*	26.6	23.3	0.0178*
Tasa cancelación transferencia por mala calidad (%)**	6.47	7.06	N.S
Tasa gestación (beta positiva) (%)**	72.6	76.1	N.S
Tasa gestación clínica (%)**	65.6	67.5	N.S
Tasa implantación (%)***	55.8	54.9	N.S
Tasa aborto clínico (%)**	8.9	13.9	N.S

*T-student P<0.05. **Fisher P<0.05. ***Mann_Whitney P<0.05.

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

CONCLUSIONES

Según nuestros resultados, los dos tipos de medio ofrecen buenos resultados clínicos. Sin embargo, se observa una peor tasa de fecundación y un descenso en el número de blastocistos vitrificados, lo cual sugiere que la tasa de gestación acumulada podría disminuir. Estos hallazgos justificarían un estudio prospectivo randomizado para hacer una valoración de ambos medios más rigurosa.

BIBLIOGRAFÍA

Archivo adjunto

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-148: QUANTITATIVE EVALUATION OF HUMAN SPERM DNA FRAGMENTATION AND CORRELATION WITH ICSI PROCEDURES PATIENTS

S. Sadeghi Sadeghi (1), A. Palomar (2), J. Pertusa Grau (1), M.A. Silvestre (1), I. Molina (2)
(1) Universidad de Valencia, Departamento de Antropología Física y Fisiología Animal, Valencia (2) Hospital Universitari i Politècnic La Fe of Valencia

INTRODUCTION

Around 40% of infertility cases caused by male factor due to significant declines in semen quality. Sperm DNA integrity (SDI) is a sperm functional parameter of male fertility evaluation. The DNA integrity is the sperm functional parameter that together with conventional semen parameters gives more reliable and precise diagnosis of male reproductive potential. Some studies have demonstrated that fragmentation levels correlated negatively with (FR) and embryo quality after IVF/ICSI cycles. Sperm chromatin dispersion measures the absence of damaged DNA in sperm. Spermatozoa with small halos considered as fragmented and those presenting intermediate and large halos as no fragmented.

OBJECTIVES

Correlation between male infertility and sperm quality with the level of DNA fragmentation measurement by sperm chromatin dispersion test, in ICSI patients as a quantitative data.

MATERIAL AND METHODS

Data from a cohort of 20 subfertile couples who underwent their ICSI cycle between May 2016 and June 2016 at our reproductive medicine center.Male patients with normoespermia, asthenozoospermia and aligoasthenozoospermia, were included in this study. An aliquot of 100 microliters of prepared sperm sample used in ICSI were stored frozen in cryovials. Once all samples included were collected, DNA fragmentation analyses were performed. All male participants aged between 25-40 years. Samples were collected by masturbation after 2 to 5 days of abstinence. After liquefaction, the samples were examined for concentration and progressive motility according to the World Health Organization (WHO). Semen samples were prepared by swim-up technique DNA fragmentation of donors was evaluated by Sperm Chromatin Dispersion test (Halosperm kit) and the halo area has been with ImageJ program. An average of 327 sperm per patient was used.

RESULTS

All samples were divided in 20 different categories, in their function of halo area measurements. Each patient was assigned a category of SDI. This quantitative value was used as DNA fragmentation assessment. We found significant differences of SDI among patients, ranging from 4.5 to 10.0 (P

CONCLUSIONS

In the present work, demonstrate that with appropriate statics, the classification can be based on the real measure of the halo size with a bigger range of variables than just fragmented or no fragmented. The actual expanse of halo is a quantitative data, which cannot be evaluated to one district value. We tried to evaluate the level of SDI using quantitative criteria. Only 20 ICSI patients were used, and we had female patients' interference when evaluating FR and pregnancy rates. The number of cases and variables presented could extend more. One limitation of the sperm chromatin dispersion (halo) is that its low-density nucleoids are relatively faint, with less contrasting image. There is no correlation between fertilization rate (Fr), sperm motility, and DNA fragmentation. The DNA fragmentation had to evaluate as a range of quantitative criteria.

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-149: TEST DE FRAGMENTACIÓN COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA DE RUTINA

T. Sánchez Arenas, M. de la Casa Heras, J. Gijón de la Santa, C. Pérez Ortiz, C. Urda Muñoz, O. López Benítez, M. Alcáraz Pérez, R. Bonache Abad, J. Rodríguez de Mesa, V. Badajoz Liébana
GINEFIV, Madrid

INTRODUCCIÓN

Aproximadamente el 20% de las parejas sufre infertilidad de origen desconocido. Este tipo de infertilidad podría estar relacionada con la integridad genética de los espermatozoides.

La fragmentación del ADN es la anomalía más común del ADN en los gametos masculinos y su análisis se considera un indicador de calidad seminal (1). Actualmente, se sabe que los espermatozoides con el ADN fragmentado pueden estar vivos, ser morfológicamente normales e incluso, capaces de fecundar correctamente un ovocito (2). Esto significa que las muestras seminales con altos niveles de fragmentación no son fácilmente detectables en los seminogramas rutinarios (3,4) y, la posibilidad de elegir un espermatozoide con el ADN dañado para realizar la ICSI debe tenerse en cuenta.

OBJETIVO

Se quiso conocer si hubo alguna calidad seminal más susceptible a tener el índice de fragmentación espermática (IFE) alterado.

MATERIAL Y MÉTODO

Se seleccionaron aquellos pacientes a los que se les había realizado un IFE entre Enero del 2012 y Septiembre del 2015. El análisis del IFE se realizó por citometría de flujo, que mide el porcentaje de espermatozoides con roturas en la cadena de DNA mediante su desnaturalización inducida por un pH bajo. Se expresa como índice de fragmentación del DNA (IFE) y es una medida precisa y repetible. Se consideró una muestra alterada cuando el IFE fue igual o superior al 27%.

RESULTADOS

Se dividió la fragmentación en tres categorías para poder estudiar más detalladamente cómo se distribuía según los grupos de calidad seminal y, se pudo observar que, en los pacientes normozoospermicos fue más común que tuvieran un IFE<13%, en los pacientes no normozoospermicos, lo más común fue que tuvieran un IFE entre 13-27% aunque muy similar al IFE≥ 27% y por último, tanto los que tuvieron la morfología alterada como los OTAN, lo más usual fue que tuvieran el IFE alterado. De estos datos pudieron concluirse que en los pacientes con al menos algún parámetro alterado, hubo una tendencia a tener un IFE más elevado.

A la vista de estos resultados, se pudo esperar que en pacientes con todos los parámetros seminales normales, la fragmentación también lo fuera y, en pacientes con todos los parámetros alterados (OTAN) o aquellos con morfología anormal, la fragmentación también lo estuviera. No obstante, no hay que olvidar que existen pacientes con un IFE alterado y parámetros seminales normales y pacientes con un IFE normal y parámetros seminales alterados.

CONCLUSIONES

El análisis del semen mediante un seminograma básico fue una herramienta de diagnóstico con un valor predictivo limitado, ya que la información aportada no analizó la integridad del genoma masculino. La integridad de la cromatina espermática es esencial para los espermatozoides. Además, se trata de una medida que en algunos casos es independiente de la calidad seminal y puede proporcionarnos información diagnóstica y pronóstico complementaria, pero distinta, de la obtenida de un seminograma.

A pesar de tener en cuenta tales premisas, los datos analizados en nuestro estudio no permiten recomendar el IFE como una prueba de rutina añadida en todos los pacientes, porque parece

TRES CATEGORIAS	IFE	N	MEDIA ⊥ DESVIACIÓN ESTÁNDAR	P-VALOR 1*2	P-VALOR 1*3	P-VALOR 2*3
NORMO	<13%	64	0,36 ± 0,48	0,02	0,01	0,70
	13-27%	63	0,17 ± 0,38			
	≥27%	39	0,20 + 0,40			
NO NORMOS	<13%	64	0,64 ± 0,48	0,03	0,17	0,63
	13-27%	63	0,80 ± 0,40			
	≥27%	39	0,78 ± 0,41			
COMUN TERATO	<13%	64	0,31 ± 0,47	0,04	0,02	0,67
	13 27%	63	0,46 ± 0,50			
	≥27%	39	0,55 ⊥ 0,50			
OTAN	<13%	64	0,04 ± 0,21	0,24	0,14	0,69
	13-27%	63	0,08 + 0,27			
	≥27%	39	0,14 ± 0,35			

que los métodos de capacitación y la técnica ICSI, hacen superar las barreras naturales de los espermatozoides con el ADN dañado que no serían capaces de conseguir una fecundación exitosa en circunstancias naturales. Únicamente en pacientes normozoospérmicos con ciclos de ICSI fallidos, podríamos encontrar en el IFE el problema reproductivo de dichos pacientes y proponerles medidas correctivas. Sin embargo, los resultados mencionados anteriormente deberían ser apoyados por estudios más completos.

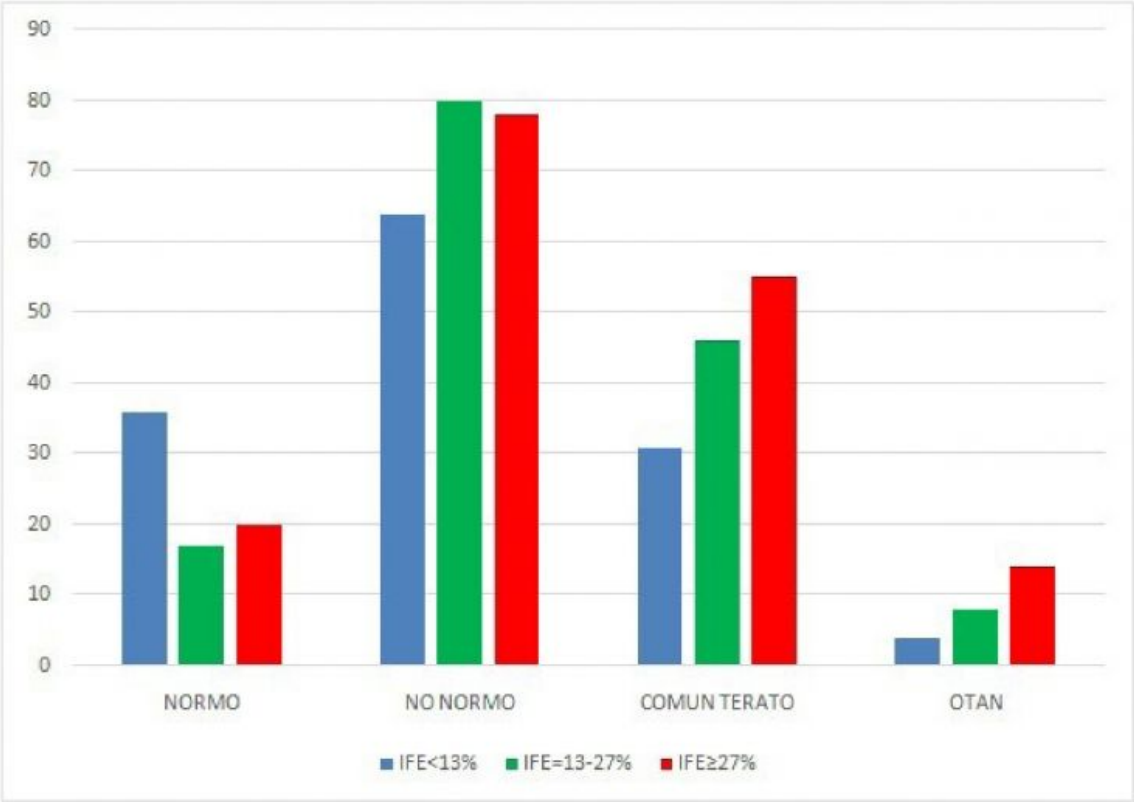
BIBLIOGRAFÍA

1. Steger K, Cavalcanti MCO, Schuppe HC. Prognostic markers for competent human spermatozoa: Fertilizing capacity and contribution to the embryo. Int J Androl. 2011;34(6 PART 1):513–27.

2. Wdowiak A, Bakalczuk S, Bakalczuk G. The effect of sperm DNA fragmentation on the dynamics of the embryonic development in intracytoplasmatic sperm injection. Reprod Biol. 2015;15(2):94–100.

3. Payne JF, Raburn DJ, Couchman GM, Price TM, Jamison MG, Walmer DK. Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques. Fertil Steril. 2005;84(2):356–64.

4. Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. Hum Reprod. 2000 Aug;15(8):1717–22.



Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-150: POSIBLE DIAPAUSA EMBRIONARIA IN VITRO TRAS DESVITRIFICACIÓN

H. Gutiérrez Rodríguez (1), A. Clavero Gilabert (1), M.C. Gonzálvo López (1), M. Navarrete Carmona (1), M. Canales Gijón (1), A. Moral Fernández (1), J. Mozas Moreno (1), A.M. Castro Rodríguez (1), P. Navas Bastida (1), J.A. Castilla Alcalá (2)
(1) Unidad de Reproducción Humana. UGC Laboratorio Clínico y UGC Obstetricia y Ginecología, HU Virgen de las Nieves, Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (IBS), Granada, Spain., (2) CEIFER Biobanco, Granada

INTRODUCCIÓN

La diapausa embrionaria, también conocida en mamíferos como implantación retardada, básicamente consiste en mantener detenido el desarrollo embrionario (dormancia). Por otra parte, uno de los parámetros clásicos para evaluar la calidad embrionaria tras la desvitrificación es que el embrión sea capaz de reanudar la mitosis, produciéndose división celular en las 24 horas posteriores a la desvitrificación. Sin embargo, si bien el potencial de implantación del embrión disminuye significativamente cuando éste no reanuda la división en un periodo de 20-24 horas tras desvitrificación ("diapausa"), varios estudios reportan una tasa de implantación aceptable tras criotransferencia de embriones que no han dividido en este periodo.

OBJETIVO

Determinar si existe algún factor predictivo que nos permita identificar los embriones no evolutivos en 24 horas tras desvitrificación con potencial de implantación (en posible "diapausa").

MATERIAL Y MÉTODO

Se llevó a cabo un estudio retrospectivo de las criotransferencias realizadas durante los años 2015 y 2016 en nuestro centro. De un total de 547 criotransferencias, se seleccionaron 76 criotransferencias de uno o dos embriones cuyas blastómeras no habían reanudado la división celular tras 24 horas de incubación tras la desvitrificación (posible "diapausa"). Se consideraron dos grupos dependiendo de si la criotransferencia había dado lugar a gestación clínica o no. Se analizaron variables clínicas de la pareja, ciclo de estimulación y desarrollo embrionario previo a la vitrificación en ambos grupos. Los estadísticos empleados fueron la t de student, la chi-cuadrado y la odds ratio.

RESULTADOS

La tasa de embarazo clínico por criotransferencia de embriones no evolutivos en 24 horas fue de un 17%. Las 13 criotransferencias que dieron lugar a gestación clínica conformaron nuestro primer grupo de estudio (en posible "diapausa"). El segundo grupo de estudio correspondió a las 63 criotransferencias en las que no se consiguió gestación clínica.

No hubo diferencias significativas entre ambos grupos respecto a las medias de edad de la mujer, media de edad del hombre, duración de la infertilidad, ni respecto a la causa de la infertilidad.

Tampoco se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto a las características de los ciclos de estimulación de los que procedían los embriones criotransferidos. El protocolo de estimulación usado con más frecuencia en ambos grupos fue el de antagonista. En cuanto a la TRA empleada tampoco hubo diferencias significativas, siendo la ICSI la que se usó mayoritariamente (69.2% vs. 81%, respectivamente).

El número de ovocitos obtenidos (11.0 ± 3.5 vs. 11.2 ± 6.4) fue similar en ambos grupos. Lo mismo ocurrió con el número de MII (9.9 ± 3.6 vs. 9.4 ± 5.3), el número de ovocitos fecundados (7.6 ± 3.3 vs. 6.7 ± 3.9), la tasa de fertilización, (76.6 ± 12.2% vs. 72.3 ± 19.8%) y la media de embriones obtenidos por ciclo (6.9 ± 2.9 vs. 6.4 ± 3.7). El número de ciclos en los que hubo transferencia en fresco y el número de ciclos en el que se vitrificaron todos los embriones fue también similar en ambos grupos.

En cuanto a la calidad previa a la vitrificación de los embriones criotransferidos, tampoco se encontraron diferencias significativas. La mayoría de los embriones eran de calidad C.

La tasa de implantación fue del 14%, implantando 15 embriones de un total de 108 embriones transferidos. De las 13 gestaciones clínicas, dos de ellas fueron gemelares, siendo la tasa de embarazo múltiple del 15%. La tasa de aborto fue del 23%, mientras que la tasa de embarazo evolutivo por transferencia fue del 13%.

CONCLUSIONES

La posible "diapausa embrionaria" observada en algunos embriones tras desvitrificación no se relaciona con características clínicas de la pareja ni del ciclo de estimulación ni de la calidad previa de los embriones.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-151: ¿DIFERIR LA TRANSFERENCIA POR RIESGO DE HIPERESTIMULACIÓN AFECTA A LA PROBABILIDAD DE ÉXITO DE UN CICLO DE FIV-ICSI?

L. Andrés Criado, M. Morales Morales, J.L. Gómez Palomares, E. Ricciarelli, J. Cuadros Fernández
Clínica FIVMadrid, Madrid

INTRODUCCIÓN

Cuando en un ciclo de FIV-ICSI una paciente tiene riesgo de padecer un síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO), hay que realizar la maduración final oocitaria con un análogo de la GnRH. Hay evidencia creciente de que esto deriva en una fase lútea deficiente; por lo tanto, no conviene realizar la transferencia embrionaria. Proceder de esa manera podría afectar la probabilidad de éxito del ciclo; sin embargo, los excelentes resultados de la crioconservación de embriones nos induce a pensar que podemos realizar la transferencia en un ciclo diferido con una probabilidad de embarazo similar a la que obtendríamos con la transferencia en fresco, sin riesgo para la paciente.

OBJETIVO

Determinar la tasa de embarazo clínico de los ciclos en los que se difiere la transferencia embrionaria por riesgo de SHO.

MATERIAL Y MÉTODO

De enero a diciembre de 2016, 48 pacientes sometidas a un ciclo de FIV-ICSI no fueron transferidas y congelaron sus embriones por riesgo de SHO. De éstas, 39 pacientes menores de 40 años se sometieron a ciclos de descongelación de embriones para realizar la transferencia en diferido. Se calcularon las tasas de embarazo clínico y de aborto en estas pacientes.

RESULTADOS

En 2 de los 39 casos ninguno de los embriones sobrevivió a la descongelación, y se canceló la transferencia (5,1%). De las 37 pacientes que se sometieron a una criotransferencia diferida para evitar el riesgo de SHO, 27 tuvieron un embarazo clínico (72,9%) y 2 de ellas terminaron en aborto (7,4%). Ninguna de las pacientes sufrió un SHO.

CONCLUSIONES

Los resultados muestran que la probabilidad de conseguir una gestación es óptima en las pacientes en las que se difiere la transferencia para evitar el riesgo de SHO. En este grupo no se produjo ningún ingreso por este motivo.

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-152: ANÁLISIS DE LOS FACTORES DEL ÉXITO DE LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

T. Álvarez Fernández (1), D. Rodríguez Pérez (2), R. Requeijo Pascual (2), M. Pombar Pérez (2)
(1) Hospital Universitario Lucus Augusti, Lugo (2) Complejo Hospitalario Universitario de Vigo, Vigo, Pontevedra

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de reproducción asistida (TRA) - como la fecundación in vitro (FIV) o la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) - son técnicas de alta complejidad, que consisten en extraer los óvulos mediante punción folicular, para después fecundarlos en el laboratorio con los espermatozoides del varón. La diferencia entre dichas técnicas es el proceso de unión del óvulo y el espermatozoide.

El éxito de estas TRA depende de factores como la calidad de los ovocitos y del esperma, la causa de infertilidad, el índice de masa corporal (IMC), además de la edad de la mujer, uno de los más influyentes.

OBJETIVO

Análisis de la edad, el IMC y la causa de infertilidad como factores del éxito de las técnicas FIV e ICSI.

MATERIAL Y MÉTODO

Se realiza un análisis retrospectivo de datos recogidos desde enero de 2015 hasta octubre 2016, incluyendo en el estudio todas las mujeres sometidas a FIV o ICSI. Tras descartar ciclos por datos insuficientes, la cohorte final consistió en 204 pacientes sometidas a 213 ciclos, de los cuales 9 realizaron dos ciclos durante este periodo.

Como factores estudiados se consideran la edad (años), la causa de infertilidad (desconocida, factor masculino, factor femenino y mixto), y el IMC – calculado como cociente entre peso corporal (Kg) y talla (m2)-, dividiendo a las mujeres en peso normal (

2) y, sobrepeso y obesas (≥25kg/m2).

Para confirmar la existencia de embarazo clínico, se realiza la determinación analítica de la HCG (mediante electroquimioluminiscencia de Roche®, con sensibilidad funcional de 0,050ng/mL, y un rango de medida de 0,03-50ng/mL) a los quince días desde la transferencia embrionaria, junto con la ecografía realizada a los 20 días.

En el análisis estadístico se propone un modelo de regresión logística para valorar la influencia significativa de los factores examinados en este trabajo: edad, causa de infertilidad e IMC.

RESULTADOS

De un total de 213 ciclos realizados durante este periodo, la tasa de gestación por ciclo fue de 29,11%.

En el modelo propuesto se considera el éxito de gestación como variable a explicar, siendo la edad, el IMC y la causa de infertilidad las variables explicativas de este fenómeno. Los resultados han evidenciado, en primer lugar, la influencia significativa de la edad y la causa de infertilidad como factores determinantes del éxito de las TRA analizadas. Es decir, a mayor edad (>38 años), la probabilidad de gestación se reduce en un 75,99% para un intervalo de confianza del 99% (p-valor: 0,003), mientras que, si la infertilidad se deriva de un factor masculino o mixto, la probabilidad de gestación es un 26,14% menor para un intervalo de confianza del 95% (p-valor: 0,031). En segundo lugar, los resultados no confirman el IMC como determinante del éxito de gestación, siendo éste no estadísticamente significativo (p-valor: 0,342).

CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos para un total de 213 ciclos, se ha puesto de manifiesto que, tanto la edad como la causa de infertilidad actúan como determinantes de la tasa de gestación de las mujeres sometidas a técnicas de reproducción asistida como FIV o ICSI. Por su parte, los resultados demuestran que el IMC no actúa como factor determinante del éxito de gestación.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-153: INFLUENCIA DEL TIEMPO EN QUE SE PREPARA LA DOSIS DE DECAPEPTYL EN LOS RESULTADOS DE LAS ESTIMULACIONES OVÁRICA

M. Granados Valle, E. Criado Scholz, A. Yus Castán, M. Hernández Díaz
FIVMARBELLA, Marbella, Málaga

INTRODUCCIÓN

El Decapeptyl® es un medicamento que está indicado en mujeres que están sometidas a tratamiento para la infertilidad o donación de óvulos, en la inducción de la ovulación controlada.

Esta medicación la deben administrar en una fecha y hora específica, por lo que se les facilita para que lo realicen en sus domicilios en el tiempo indicado.

En la práctica clínica hemos observado la gran dificultad que poseen algunas de las donantes de óvulos, en la preparación y administración de dicha medicación.

OBJETIVO

Comparar el resultado de las estimulaciones ováricas de las donantes, que han preparado por sí mismas el medicamento justo antes de la hora de la administración indicada (grupo 1) vs las donantes que se lo han llevado preparado de la clínica, con varias horas de antelación (grupo 2).

MATERIAL Y MÉTODO

Realizamos un estudio descriptivo comparativo, en el que se han seleccionado 80 donantes, de entre 18-34 años, que se sometieron a un ciclo de donación, entre Febrero y Mayo de 2016, período en el cual se preparaba la medicación en la clínica por parte del equipo de enfermería para todas ellas.

Los distintos ciclos de donación para la misma donante, han seguido la misma pauta de FSH.

Se tomaron datos de los folículos mayores de 16mm el día de la programación de la punción ovárica y los óvulos maduros obtenidos.

Se han comparado los datos de las punciones cuando la donante preparara la medicación en su casa justo antes de la hora de la administración, con aquéllos en donde la medicación es preparada en la clínica 8h antes de la administración, como tiempo máximo.

Todas las donantes que no cumplían estos requisitos, fueron descartadas.

RESULTADOS

De la muestra seleccionada, se descartaron 67 donantes por no cumplir los requisitos marcados.

De las 23 donantes restantes se observó que en 17 casos se obtenían más óvulos maduros si preparaban la medicación por sí mismas (grupo 1), con una media de 6,76 óvulos maduros más, por punción.

En 6 casos se obtuvieron más óvulos maduros con la medicación preparada en la clínica (grupo 2), con una media de óvulos 7,83 maduros más, por punción.

En la muestra estudiada existe una diferencia significativa entre el grupo 1 y 2, en cuanto al número de óvulos maduros obtenidos (73,9 vs 26,0 %).

CONCLUSIONES

Según los resultados analizados, existe una tendencia a aumentar el número de óvulos maduros obtenidos cuando la donante prepara la dosis de Decapeptyl® en casa, justo antes del momento de administración indicada, que cuando se le prepara horas antes en la clínica.

Esto podría sugerirnos que el momento en qué se prepara la medicación y su viabilidad podrían modificar los resultados de las estimulaciones ováricas. Sin embargo no hemos encontrado recomendaciones en la ficha técnica del medicamento acerca de cuántas horas puede conservarse el medicamento preparado sin ser administrado. Tampoco existen estudios previos donde se demuestre la pérdida de eficacia del medicamento preparado con varias horas de antelación.

Como limitación al estudio tenemos el tamaño muestral. Por tanto más estudios serán necesarios para confirmar la pérdida de eficacia del medicamento preparado con varias horas de antelación antes de su administración.

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-154: ANALISIS SOCIODEMOGRAFICO DE VARONES QUE ACUDEN A LA CONSULTA DE FERTILIDAD Y SU RELACION CON LOS VALORES DEL SEMINOGRAMA

M.C. García Gómez, E. Saucedo de la Llata, M.R. Moraga Sánchez, I.O. Carmona Ruiz, J.J. López Reyes
Instituto Mediterráneo Asociados en Reproducción, Murcia

INTRODUCCIÓN

La importancia de los temas de reproducción en nuestra sociedad se hace cada vez más evidente. Las causas de la infertilidad masculina es uno de los temas de la reproducción asistida que ha ido en aumento en los últimos años, siendo la disminución global en la calidad seminal de los más investigados. En la última década, la elevada industrialización en nuestra región la sitúan a la cabeza en estudios relacionados con las alteraciones en el semen del varón. Son poblaciones con mucho desarrollo industrial y agrícola, pudiendo afectar en los parámetros reproductivos masculinos debido a la exposición a tóxicos o químicos ambientales, infiriendo sobre la calidad espermática y llegando a causar infertilidad.

Así pues, las alteraciones sufridas por el varón pueden atribuirse a distintas exposiciones profesionales y/o ambientales. No obstante, no sólo los agentes tóxicos pueden alterar la calidad seminal, sino que también el estilo de vida.

Por todo ello, actualmente existe un aumento en el predominio de las alteraciones de la infertilidad de las parejas debido por una parte al varón que está más sometido a procesos agresivos y tóxicos y a la decisión de la mujer de retrasar la maternidad.

OBJETIVO

El objetivo general de este estudio preliminar fue analizar y valorar la posible relación que puede existir entre las alteraciones seminales y los factores demográficos y ocupacionales de los varones de la región de Murcia mediante los datos obtenidos de la entrevista y los espermiogramas de los pacientes de la clínica.

MATERIAL Y MÉTODO

Se revisó un muestreo inicial de 400 historias y espermogramas realizados en la consulta de fertilidad. El análisis de los parámetros seminales se realizó siguiendo las recomendaciones de la OMS (2010).

RESULTADOS

Existe un aumento en la media de la edad (37 años) de los pacientes que se someten a tratamientos de reproducción asistida.

De momento de los espermogramas estudiados, 60 individuos (15%) pertenecían a zonas con mayor industrialización, por tanto, con mayor exposción a tóxicos medioambientales; destacando en este estudio preliminar las poblaciones de Alcantarilla y de Molina del Segura.

De momento de los 400 individuos estudiados, el 41% desarrollan actividades laborales de derivados mayormente de la agricultura convencional.

De las regiones consideradas de riesgo sólo 1 de cada 5 individuos (22%) no tienen alteraciones en el espermograma.

De los pacientes del estudio que desarrollan una ocupación de riesgo sólo 1 de cada 10 individuos (14%) no tienen alteraciones en el espermograma.

En las 400 entrevistas de los espermogramas preliminares estudiados se valoró también el consumo de tabaco, no obteniéndose diferencias estadísticamente significativas que lo relacionen con las alteraciones espermáticas.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran que existe una posible relación entre la exposición a múltiples sustancias químicas ambientales y ocupacionales y el aumento en las alteraciones de los espermogramas masculinos siguiendo los criterios dictados por la OMS en el 2010; no obstante, no son del todo concluyentes, debido a que los datos no mostraron resultados estadísticamente significativos. Necesitaríamos seguir aumentando nuestra la N muestral para poder afirmar que existe tal relación, además de determinar más factores condicionantes.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-155: QUÉ TIPO DE PACIENTES SE VEN BENEFICIADOS DEL CULTIVO LARGO

T. Sánchez Arenas, M. de la Casa Heras, J. Gijón de la Santa, C. Pérez Ortiz, C. Urda Muñoz, O. López Benítez, M. Alcáraz Pérez, R. Bonache Abad, J. Rodríguez de Mesa, V. Badajoz Liébana
GINEFIV, Madrid

INTRODUCCIÓN

El ovocito humano se fecunda en las trompas de Falopio y se va desarrollando durante su transporte hacia el útero, donde se implantará en estadio de blastocisto. El cultivo de blastocistos o cultivo largo puede considerarse como parte de la selección natural que sufren los embriones durante su desarrollo, siendo aquellos que llegan a dicho estadio los que tienen mayores probabilidades de implantación y embarazo (1)(2).

La morfología embrionaria ha sido el principal método utilizado por los embriólogos para evaluar el desarrollo y seleccionar el mejor/es embrión/es para transferir o criopreservar. La observación de la morfología hasta día +3, se basa más bien en la propia morfología del ovocito que en la verdadera fisiología del embrión (3). Las principales ventajas del cultivo largo implican: sincronización del embrión con el tracto femenino y la evaluación de la viabilidad del embrión propiamente (4)(5). No existe un consenso claro para decidir transferir los embriones en día +3 o +5, aunque hay una tendencia lógica a dejarlos a cultivo largo cuando hay un mayor número de embriones en día +3.

OBJETIVO

Se realizó estudio retrospectivo no randomizado y, utilizado ciclos de ICSI con cultivo largo, se evaluó qué tipo de pacientes se vieron beneficiados del cultivo largo.

MATERIAL Y MÉTODO

Se seleccionaron todos los ciclos de cultivo largo realizados entre Enero del 2012 y Septiembre del 2015. El resultado de dicha selección fue 662 pacientes que llevaron sus embriones a día +5 de desarrollo generando 2898 embriones en estado de blastocisto. Se incluyeron tanto los ciclos con ovocitos propios y donados, como los ciclos con semen homólogo y heterólogo.

El análisis estadístico se realizó mediante el programa informático SPSS 23.0. La significación estadística se determinó como $p<0,05$. Se realizaron modelos de regresión logística binaria para ver qué calidades fueron las que influyeron significativamente en la tasa de llegada a blastocisto y la tasa de gestación clínica.

RESULTADOS

Los modelos de regresión logística se realizaron para dos variables dependientes: la llegada a blastocisto de al menos el 60% de los embriones y la consecución de la gestación clínica en función de las calidades propuestas en día +3 o +5.

Cuando se analizó el valor predictivo de las calidades embrionarias se observó que, en las receptoras de ovocitos y en las pacientes con ovocitos propios mayores de 35 años, las calidades embrionarias propuestas en día +5 tuvieron mayor valor predictivo que las propuestas en día +3. Sin embargo, las pacientes con ovocitos propios menores de 35 años, las calidades propuestas en +3, concretamente la calidad C, tuvo mayor valor predictivo que las calidades propuestas en día +5 en la consecución de la gestación clínica.

CONCLUSIONES

El grupo de receptoras de ovocitos y ovocitos propios mayores de 35 años se vieron estadísticamente beneficiadas del cultivo largo. Los primeros porque se seleccionó el mejor/es embrión/es para transferir de todos los que llegaron hasta día +5, transfiriendo embriones con su genoma activado para maximizar las probabilidades de gestación evolutiva. Los segundos porque no todos los embriones fueron a ser capaces de llegar a blastocisto debido a su factor etario, de esta manera, se transfirieron únicamente aquellos que fueron capaces de llegar.

Sin embargo, las pacientes con ovocitos propios menores de 35 años, no se vieron estadísticamente más beneficiadas por el cultivo largo que por la transferencia en día +3. Estas pacientes fueron pacientes con problemas tubáricos o de factor masculino, que tras la ICSI pudo solventarse. El cultivo largo en estas pacientes tampoco fue perjudicial, simplemente no les confirió un beneficio adicional al que ya tiene de por sí.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pauerstein CJ, Eddy CA. The role of the oviduct in reproduction; our knowledge and our ignorance. J Reprod Fertil. 1979;55(1):223–9.

2. Diaz S, Ortiz ME, Croxatto HB. Studies on the duration of ovum transport by the human oviduct. III. Time interval between the luteinizing hormone peak and recovery of ova by transcervical flushing of the uterus in normal women. Vol. 137, American Journal of Obstetrics and Gynecology. 1980. p. 116–21

1. Scholtes MC, Zeilmaker GH. A prospective, randomized study of embryo transfer results after 3 or 5 days of embryo culture in in vitro fertilization. Fertil Steril. 1996 Jun;65(6):1245–8.

2. Edwards RG, Fishel SB, Cohen J, Fehilly CB, Purdy JM, Slater JM, et al. Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. J Vitr Fertil Embryo Transf. 1984 Mar;1(1):3–23.

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-156: IMPACTO DE LA EDAD EN LA SELECCIÓN DEL BLASTOCISTO

B. Sánchez Ruiz, M. Hebles Duvison, M. Guijarro Notario, M. Lastra Salazar, L. Aguilera Duvison, P. Piqueras Trilles, M. Martínez Sáez, C. Escobar García, F. Sánchez Martín, P. Sánchez Martín
Clínica Ginemed, Sevilla

INTRODUCCIÓN

La transferencia en día 5 frente a día 3 aumenta la tasa de gestación al seleccionar el embrión con mayor capacidad de implantación, permitiendo realizar transfer de embrión único y evitando gestaciones múltiples. La selección embrionaria se realiza según los criterios de ASEBIR donde la calidad del trofoectodermo (TE) cobra mayor importancia frente a la calidad de la masa celular interna (MCI). Otros trabajos establecen criterios de selección embrionaria en estadio de blastocisto diferentes en función de la edad de las pacientes.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es por un lado determinar si los parámetros de selección embrionaria en estadio de blastocisto (MCI y TE) son diferenciales en las pacientes en función de su edad, y si la clasificación utilizada es la que genera más gestaciones evolutivas o por el contrario en nuestras pacientes existe una tendencia diferente.

MATERIAL Y MÉTODO

Se realiza un análisis retrospectivo de los resultados de transferencias realizadas entre marzo de 2014 y febrero 2017. Se analiza la calidad de MCI y TE en 614 transferencias de embriones frescos de pacientes de ovodonación con resultado positivo de betaHCG y confirmación de embarazo por latido fetal positivo en semana 7. Se analizan dos grupos por separado, incluyendo el primer grupo aquellas pacientes menores de 35 años (88 pacientes) y el segundo, pacientes a partir de 35 años (524 pacientes). Se analizó la calidad de la MCI y del TE de los blastocistos transferidos. Los criterios de selección embrionaria seguidos son los establecidos por ASEBIR.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos son los siguientes:

< 35 AÑOS				>= 35 AÑOS			
MCI		TE		MCI		TE	
A	35,83%	A	39,55%	A	30,17%	A	29,69%
B	55,97%	B	44,77%	B	57,07%	B	53,36%
C	8,2%	C	15,68%	C	12,76%	C	16,95%

En pacientes menores de 35 años encontramos que el 53,85% de los embriones transferidos presentaban una calidad superior en la MCI con respecto a la calidad del trofoectodermo y solo el 46,15% presentaban una calidad superior del TE frente a la calidad de la MCI.

En pacientes con 35 años o más el 57,62% de los blastocistos transferidos presentaban una mayor calidad de la MCI frente a la calidad del trofoectodermo y sin embargo el 42,37% presentaban una mayor calidad del TE frente a la MCI.

CONCLUSIONES

Los resultados sugieren una tendencia hacia una mejor calidad de la MCI frente a la de TE en aquellos blastocistos que han generado gestación en nuestras pacientes en ambos grupos de edad; sin embargo, es necesario realizar más estudios a este respecto que incluyan un mayor número de casos para poder obtener diferencias estadísticamente significativas.

Con estos datos, podemos sugerir que posiblemente no haya que limitarse como primera elección a un embrión en el que el trofoectodermo sea mejor si hay otros blastocistos con una buena calidad de MCI puesto que vemos una tendencia a mayor gestación evolutiva cuando existe una buena MCI.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-157: EMBRIONES DE BUENA CALIDAD EN CICLOS MIXTOS: ¿FIV CONVENCIONAL O ICSI?

C. Romero Játiva, Y. Cabello Vives, E. López Gallego, C. Cámara García, D. Ordoñez Pérez
QuironSalud Ruber Juan Bravo, Madrid

INTRODUCCIÓN

La FIV convencional y la ICSI son las dos técnicas para lograr la fecundación in vitro en reproducción asistida. La ICSI es un tratamiento eficaz en los casos de factor masculino severo y también cuando hay un fallo de fecundación en un ciclo de FIV previo. Por otro lado, la indicación principal de la FIV convencional es la esterilidad por factor tubárico. La disminución del factor femenino, el aumento del factor masculino y la edad materna pueden explicar el aumento de la ICSI en los últimos años. Sin embargo, se han llevado a cabo diversos estudios que comparan el desarrollo embrionario tras realizar ciclos mixtos y no encuentran diferencias significativas.

OBJETIVO

Comparar si la calidad de los embriones en día 3 y 5 de desarrollo preimplantatorio es superior en los embriones microinyectados (ICSI) que en los obtenidos por fecundación in vitro convencional (FIV) tras realizar ciclos mixtos de FIV e ICSI.

MATERIAL Y MÉTODO

Se recopilaron los datos de los ciclos mixtos realizados entre enero del 2016 y mayo del 2017. Fueron descartados ciclos con factores masculinos severos, ya que en esos ciclos sólo se realizó ICSI. Se incluyeron tanto los ciclos con ovocitos propios como los ciclos procedentes de ovodonación, obteniendo un total de 50 ciclos, 36 de los cuales fueron ciclos con ovocitos propios y los 14 restantes de ovocitos procedentes de óvulos donados. Se cuantificó el número de embriones de buena calidad transferibles o vitrificables en D3 y D5 de desarrollo de ICSI y de FIV respectivamente, en ambos tipos de ciclos. Se debe tener en cuenta que los ovocitos asignados para FIV clásica eran los que tenían aspecto inmaduro, mientras que los que previsiblemente eran MII se derivaron a ICSI.

RESULTADOS

En ambos tipos de tratamiento, ciclos propios y de ovodonación, cerca del 30% (29.95%) de los óvulos microinyectados dan lugar a embriones de buena calidad. Sin embargo, en una FIV convencional, la cifra se reduce al 22% (22.08%) de los ovocitos inseminados.

CONCLUSIONES

1. Es importante la selección previa de los ovocitos asignados a microinyección o inseminación en función de su madurez, determinada principalmente por el aspecto de sus células de la granulosa y el complejo corona-cumulus.

2. Los embriones obtenidos a partir de ovocitos que han madurado in vitro, parecen ser de menor calidad en D5 que los ovocitos ya maduros que se dejan fecundar en FIV o se denudan y microinyectan por ICSI.

3. Parece ser que el factor que determina la calidad embrionaria es la madurez ovocitaria a la hora de ser fecundados y no la técnica en sí misma, ya que se ha comprobado que en los casos de FIV clásica de doble donación (ambos gametos donados), donde la mayoría de ovocitos son maduros, se obtienen embriones de buena calidad en D5.

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-158: IMPACTO DE LA BIOPSIA DE BLASTÓMERAS SOBRE EL POTENCIAL REPRODUCTIVO DE EMBRIONES TEMPRANOS

A.P. Ortiz Velasco, C.C. Álvarez Santana, J.C. Alberto Bethencourt
CERT - Centro de Endocrinología de la Reproducción de Tenerife, Santa Cruz de Tenerife

INTRODUCCIÓN

El Diagnóstico Genético Preimplantacional (PGD) y screening (PGS) consiste en un conjunto de técnicas utilizadas para determinar el estatus cromosómico de un embrión antes de su transferencia o vitrificación. Está indicado en pacientes con riesgo de transmisión de enfermedades hereditarias a la descendencia, ya sean afectados o portadores de las mismas, así como mujeres de edad avanzada, casos de abortos de repetición o en sucesivos fallos de implantación. Para llevarlo a cabo, es necesario realizar la biopsia o extracción de una o varias células del embrión, cuyo genoma es analizado por diversas técnicas. Actualmente, el 90% de las biopsias en clínicas de Reproducción Humana Asistida se llevan a cabo en los primeros, pero las diversas limitaciones que presenta, como la baja cantidad de ADN extraído o el impacto a la viabilidad de los mismos, hacen cuestionable su uso y sustitución por la biopsia del trofoectodermo en el blastocisto. En la actualidad, conocemos la gran diversidad de trabajos que demuestran las mayores tasas de implantación y gestación clínica a partir de transferencias realizadas con blastocistos; además, con ellos hay menor probabilidad de gestación múltiple y la criopreservación será más eficiente al vitrificar ejemplares que serán de una mayor calidad al haber alcanzado ese estadio. Igualmente, los nuevos medios de cultivo secuencial permiten obtener una tasa de blastocisto del 40-60%. Asimismo, los principales parámetros de selección embrionaria resultan ser morfológicos y, por tanto, dependen de la opinión subjetiva de cada embriólogo. Sin embargo, el uso de la tecnología time-lapse ha demostrado ser de gran utilidad para predecir la potencialidad reproductiva de los embriones.

OBJETIVO

Determinar el impacto que tiene la biopsia embrionaria sobre el potencial reproductivo de ambos tipos de embriones.

MATERIAL Y MÉTODO

Un primer estudio retrospectivo comparó el efecto de la biopsia en la supervivencia y blastulación de los dos mejores embriones del día 3 de la cohorte de cada paciente incluida en el experimento. Por otro lado, un experimento que empleó tecnología de time-lapse comparó los tiempos de división entre embriones tempranos sometidos a biopsia y otro grupo en día 3 de desarrollo que no sufrió este proceso.

RESULTADOS

A llegada a blastocisto es similar entre los embriones biopsiados y los no biopsiados: este proceso no afecta a la blastulación. Por tanto, resulta claro que debe considerarse la prolongación de los embriones biopsiados a cultivo largo, beneficiando esto a las pacientes, ya que reciben embriones de mejor calidad y se evitan gestaciones múltiples al tener la posibilidad de transferir un solo blastocisto sano. Asimismo, el resto de la cohorte, que se considera sana desde el punto de vista genético, también es de mejor calidad al no haber detenido su desarrollo durante los 5 días, de tal manera que la vitrificación de la misma será mucho más eficiente.

Sin embargo, el estudio de time-lapse demostró que ese proceso invasivo ralentizaba, por una parte, el ciclo celular en el que estaba el embrión cuando se extrajo la blastómera, pero también influía en la duración de los sucesivos procesos de desarrollo. Como resultado, la compactación y el tiempo de blastulación se daban de manera retardada en el tiempo. Cabe destacar que la morfocinética post-biopsia es significativamente más rápida en embriones que implantaron, mientras que los que no lo hicieron muestran un retraso en el tiempo de compactación y blastulación.

CONCLUSIONES

No hay diferencias significativas entre la llegada a blastocisto entre embriones biopsiados y embriones que no han sufrido este proceso.

Los estudios de time-lapse demuestran un retraso en el desarrollo de embriones tempranos biopsiados, lo cual puede influir en la probabilidad de implantación debido a la falta de sincronización con el endometrio.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-159: INFLUENCIA DEL MEDIO ÚNICO DESPUÉS DE 6 DÍAS VS 5 DÍAS DE CULTIVO EN LAS CRIOTRANSFERENCIAS

B. López Lería, E. Criado Scholz
FIVMARBELLA, Marbella, Málaga

INTRODUCCIÓN

La optimización de la vitrificación de embriones en estadio de blastocisto ha supuesto un "gold standar" en la mejora de las tasas de embarazo en ciclos de criotransferencias (FET), en los centros de reproducción asistida. En consecuencia la optimización del cultivo de los embriones y por tanto la composición de los medios, juegan un papel fundamental en la obtención de blastocistos de óptima calidad.

OBJETIVO

Comprobar si existe diferencia en las tasas de embarazo (Beta hCG) en los ciclos de criotransferencias de blastocistos vitrificados en día 6 (FET D+6), cuando los embriones han sido cultivados con medio único durante 6 días, frente a aquellos que han sido cultivados con medio único durante 5 días.

MATERIAL Y MÉTODO

Blastocistos en D+6 de buena calidad procedentes de ovodonación, fueron cultivados en el laboratorio de nuestro centro, en medio único (1-step Origio), y posteriormente vitrificados. Para el primer grupo, el medio de cultivo único preparado el día anterior a la microinyección, no fue reemplazado hasta el final del cultivo (D+6), por tanto se empleó durante 6 días; y en el segundo grupo el medio de cultivo único preparado también el día anterior, si fue reemplazado en D+1, empleándose así durante 5 días.

RESULTADOS

Entre Enero y Diciembre 2016 se realizaron 32 FET D+6, de las cuales 21 fueron con embriones del primer grupo y 11 con embriones del segundo grupo, con unas tasas de embarazo mayores para el segundo grupo versus primer grupo. (38 vs 54,5%).

En el primer grupo se transfirieron 10 casos con un solo embrión (SET) y 11 casos con dos embriones (DET), existiendo diferencia en las tasas de embarazo entre ambos subgrupos: 20% vs 54,5%. En el segundo grupo se transfirieron 4 casos con SET y 7 casos con DET, sin diferencias (50% vs 54,5%).

CONCLUSIONES

Analizando los datos de ambos grupos, observamos diferencia significativa en las tasas de embarazo entre renovar el medio en D+1 (grupo 2) y no hacerlo (grupo 1). Esto podría sugerir que el desarrollo embrionario puede verse comprometido por el metabolismo y la secreción de componentes al medio de cultivo único tras 6 días, lo que podría condicionar la calidad de los blastocistos que son vitrificados y posteriormente transferidos y que podría interferir negativamente en la consecución de una gestación.

También observamos que en las FET D+6 del grupo 1, en las que se transfiere un solo embrión existen menores tasas de embarazo que con el grupo 2, lo cual podría confirmar la hipótesis de que cambiar el medio aumenta las posibilidades de alcanzar blastocistos con mayor potencial de implantación.

El estudio preliminar de los datos nos indica que refrescar el medio podría mejorar las tasas de embarazo en ciclos de criotransferencias en D+6, pero más estudios serán necesarios para poder apoyar esta hipótesis.

Rev Asoc Est Biol Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-160: LOS BENEFICIOS DE LA BIOPSIA EN BLASTOCISTO

I. Cela Dapena, A. Pérez Gallastegui, N. Bilbao Aldaiturriaga, A. Tio Castro, J. Valle Artetxe, M. Barasoain Hernández, D. Gonzalez Abreu, L. Bretaña García de Andoín, I. Davalillo Bilbao
Instituto iGin S.L., Bilbao, Bizkaia

INTRODUCCIÓN

Las aneuploidías son una de las principales causas de la infertilidad en mujeres de edad avanzada. Está descrita como la razón principal de fallos de implantación y abortos. El Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) proporciona información cromosómica de cada embrión biopsiado, evitando así la transferencia de embriones aneuploides, y a su vez aumentando las tasas de implantación.

Esta técnica ha sido desarrollada en embriones de estadío celular, sin embargo las biopsias en este estadío de evolución embrionaria han mostrado ser más perjudiciales que en el estadío de blastocisto. Además, esta técnica es mucho menos invasiva y fiable para los embriones. Por todo ello, nuestro equipo ha implantado la biopsia en blastocisto en nuestro laboratorio.

OBJETIVO

El objetivo principal de este estudio es poder comparar las tasas de implantacón de embriones biopsiados en estadío celular frente a embriones biopsiados en blastocisto y así poder confirmar los beneficos de la misma.

MATERIAL Y MÉTODO

Un total de 204 pacientes con indicación de DGP entre los años 2013 y 2016. De estos, 151 se les realizó la biopsia en estadio celular, siendo analizados por hibridación genómica comparada (aCGH) y 53 fueron biopsiados en estadio de blastocisto y estudiados a traves de secuenciación masiva (NGS).

RESULTADOS

En las biopsias realizadas en estadio celular observamos mayores tasas de implantacion en pacientes menores de 38 años (53,84% en 42 pacientes) que en pacientes mayores de 38 años (32,14% en 49 pacientes).

La tasa en biopsia de blastocisto para mayores de 38 años es del 20% en solo 11 pacientes realizasas.

CONCLUSIONES

Se puede apreciar que el número de embriones euploides obtenidos es mayor cuando la biopsia es realizada en blastocisto debido a que en el salto de desarrollo entre los dias 3 y 5 de evolución hay una selección natural descartando a todos los embriones que no sean capaces de evolucionar.

Por otro lado, a pesar de tener una tasa de implantación menor en biopsia de blastocisto creemos que es debido al tamaño de la muestra y a la escasa experiencia en esta nueva técnica. Por lo que esperamos en un futuro a igual experiencia y tamaño de muestra los resultados sean mejores que los obtenidos hasta la fecha en estadio celular.

Rev Asoc Est Biol Rep Noviembre 2017 Vol. 22 Nº 2

P-161: CULTIVO LARGO, VALORACIÓN EMBRIONARIA EN D+3 Y D+5 Ó VALORACIÓN ÚNICA EN D+5

B. Renilla García, E. Criado Scholz
FIV MARBELLA, Marbella, Málaga

INTRODUCCIÓN

El cultivo embrionario es un factor determinante a tener en cuenta en el éxito de un tratamiento de fertilidad. Este cultivo embrionario puede ser corto (2, 3 días) o largo (5, 6 días). El cultivo largo nos proporcionará mucha más información sobre los embriones y podremos elegir el embrión que reúna las características más apropiadas para aumentar las probabilidades del éxito del tratamiento.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio es demostrar que en el cultivo largo hasta blastocisto, no alterar las condiciones de los embriones en día 3 puede influir aumentando las tasas de blastulación y de B-HCG positivas, frente a los tratamientos en los que los embriones se valoran en día 3, optimizando el trabajo de laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODO

El estudio se ha basado en los datos de los tratamientos de fertilidad de nuestra clínica, tanto tratamientos donde se utilizan óvulos propios de la pareja, óvulos procedentes de donantes, muestra de semen de la pareja o muestra de semen de donante.

El tratamiento de la muestra de esperma se ha realizado utilizando gradientes de densidad (SupraSperm 100%, Origio), MACs (Miltenyi Biotec) y PICSI (SpermSlow, Origio) en función de los requerimientos del tratamiento.

La microinyección se realizó 40h después de la administración del decapeptyl en el caso de utilizar óvulos frescos y 1h después de la desvitrificación (Thawing media, KITAZATO) si los óvulos estaban criopreservados (Vitrification media, KITAZATO).

Realizamos un cultivo en medio único (1-Step, Origio), observando los embriones en D+1(para ver fertilización), D+3 y posteriormente en D+5 para ver blastocistos. Por otro lado, a partir del segundo semestre de 2015, los embriones fertilizados solamente se observaban en en D+1 para ver fertilización y D+5 para ver blastocistos.

RESULTADOS

A la vista de los resultados podemos ver que no hay diferencias en las tasas de fertilización, pero si vemos un incremento en las tasas de blastulación y B-HCG positivas en aquellos tratamientos en los que no se valoran los embriones en D+3.

También podemos observar una disminución progresiva en las tasas de "no transferencias", por no tener blastocistos en D+5, entre los tratamientos donde se ha valorado el D+3 y los que no se ha valorado.

CONCLUSIONES

En base a nuestros resultados, podemos concluir que no alterar las condiciones del cultivo largo, desde la valoración de la fertilización hasta el día de la transferencia en día 5, se pueden incrementar las tasas de blastulación y B-HCG positivas. El aumento de estas tasas se debe a que los embriones permanecen en las condiciones de cultivo ideales durante el mayor tiempo posible, sin ser sometidos a ninguna alteración.

Otro dato importante, es la disminución de la cancelación del tratamiento por no tener blastocistos en D+5, observando una disminución progresiva a lo largo de los años, dato que corrobora nuestra teoría de que no molestar los embriones hasta D+5, ayuda a incrementar las tasas de blastulación, transferencias embrionarias y B-HCG positivas. Con estos resultados observamos que podemos optimizar el trabajo del laboratorio, al no tener que estar pendiente de los embriones en día 3.

	n	% FECUNDACIÓN	% BLASTULACIÓN	% B-HCG POS
Con valoración en D+3	203	78,01%	55,00%	54,84%
Sin valoración en D+3	264	77,03%	67,96%	60,71%

	2014	2015 (1ºsemestre)	2015 (2ºsemestre)	2016	2017
% NT por no tener BL valorando D+3	9,60%	7,69%	NV	NV	NV
% NT por no tener BL no valorando D+3	NV	NV	1,63%	2,94%	0,00%

REVISTA DE EMBRIOLOGÍA CLÍNICA Y BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

www.asebir.com

ASEBIR

UNA APUESTA POR LA CALIDAD