

ASEEBIR

EMBRIOLOGÍA CLÍNICA Y BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

JUNIO 2016 **VOL. 21 N° 1**

5 NO SIN GARANTÍAS

8 INFLUENCIA DE LOS EVENTOS CITOCINÉTICOS
EN LA CALIDAD EMBRIONARIA
CONVENCIONAL.

16 VITRIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES.

23 EXISTEN DIFERENCIAS EN EL SEX-RATIO DE
LOS NIÑOS NACIDOS TRAS UNA TRA? ESTUDIO
RETROSPECTIVO EN EL CHGUV.

29 MADURACIÓN IN VITRO.

38 CULTIVO A BLASTOCISTO EN LA
REPRODUCCIÓN ASISTIDA.

49 NOTICIAS

59 AGENDA



Imagen portada:

Ovocito en estadio de vesícula germinal.

Autor: IVI Valencia

SUMARIO

EDITORIAL5

No sin garantías.
Montse Boada

AULA JOVEN8

Influencia de los eventos citocinéticos en la
calidad embrionaria convencional.
Nuria Zopeque

Vitrificación de espermatozoides.
R. Dasí

Existen diferencias en el sex-ratio de los niños
nacidos tras una TRA? Estudio retrospectivo en
el CHGUV.
J G Descals

FORMACION CONTINUADA38

Maduración *in vitro*.
Laura Escrich, Noelia Grau y M^a Jose Escribá.

Cultivo a Blastocisto en la Reproducción
Asistida.
Adrián Guillermo Socas

NOTICIAS49

XXV edición de la Ayuda Merck Serono de
Investigación 2016.

Experiencias vividas en el Congreso de San
Sebastián.
Yosu Franco

Próximo Congreso Madrid 2017.
Yolanda Minguez

Premio mejor poster SEF al grupo de interés de
calidad.

Asebir en la SEF.

AGENDA59

Agenda Formación Asebir 2016.
M^a José Torelló

Junio 2016 Vol. 21 N°1

EDITA

Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción

EDITORES Y DIRECTORES CIENTÍFICOS

Dra. M^a Dolores Lozano Arana. HU Virgen del Rocío- Sevilla
Dra. Inmaculada Campos Ramírez. IVI Almería-Almería

COMITÉ EDITORIAL

Presidente:

Dra. Montserrat Boada Palá. Institut Universitari Dexeus-
Barcelona

Vicepresidenta:

Dra. M^a José Torelló Ibañez . Hospital Quirón Barcelona-
Barcelona

Secretaría y RRPP:

Dra. Anna Serra Peruchet. IBILAB-Illes Balears

Tesorería:

Dr. Josep Santaló Pedro. Universidad Autónoma de Barcelona-
Bellaterra

Patrocinios:

Dra. Aranzazu Galán Rivas. IVI Valencia-Valencia

Vocalía de Grupos de interés e investigación:

Dra. Laura Marqués Soler. Centre de Reproductio Asistida,
Clínica Sagrada Família-Barcelona

Vocalía de Publicaciones y Congresos

Dra. M^a Dolores Lozano Arana. HU Virgen del Rocío- Sevilla
Dra. Inmaculada Campos Ramírez. IVI Almería-Almería

Vocalía de Docencia y Formación

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

Vocalía Tecnología de la información y comunicación

Dr. Abel Gayo Lana. FIV4-Instituto de Reproducción
Asturiano, Oviedo
Dr. Enrique Olaya Vila. Clínica Tambre, Madrid

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

NO SIN GARANTÍAS

Montse Boada
Presidenta ASEBIR 2013-2017



Es indudable que la Reproducción Asistida en nuestro país es importante no solo por el alto nivel asistencial de nuestros centros, sino también porque somos destino de muchos pacientes que vienen buscando técnicas que no pueden realizar en su país de origen. Según la última actualización del MSSSI, de diciembre 2015, en España hay 381 centros/servicios de reproducción humana asistida, 286 privados y 95 públicos. De acuerdo a los datos reportados al Registro SEF correspondientes al año 2013, en total se realizaron 78.982 ciclos, siendo la mayoría ciclos de FIV/ICSI con ovocitos propios, un 24% con ovocitos de donante (frescos o vitrificados) y un 4.3% ciclos de DGP. En el marco de la reproducción asistida europea y a pesar de que los datos no están actualizados, España es el 5º país en cuanto a actividad según datos de la ESHRE correspondientes al año 2011.

Las técnicas que principalmente se demandan por parte de pacientes extranjeras son la Donación de gametos y el Diagnóstico Genético Preimplantacional bien por que están prohibidas en sus país de origen, o por que su realización está condicionada a circunstancias estrictas, distintas a las que nuestra normativa permite. A pesar de que no se tienen datos demasiado certeros, se estima que el 50% de los ovocitos de donante utilizados en Europa provienen de nuestro país.

Es indiscutible que España reúne una serie de circunstancias que le hacen atractiva y que atraen a pacientes de distintas procedencias lo que en definitiva se traduce en una entrada de divisas nada despreciable. Según estudios económicos realizados en España, se estima que la facturación de las TRA habrá experimentado un incremento del 24% en los últimos cinco años superando la cifra de 500 M€ en el año 2015.

Paralelamente y un poco ajenos al negocio que todo ello supone, la mayoría de los embriólogos hemos seguido trabajando en nuestros laboratorios con tesón y entusiasmo para seguir mejorando nuestro trabajo y poder ofrecer a nuestras pacientes mayores probabilidades de RNV sano en casa. Hemos ido perfeccionando procedimientos e incorporando avances. La aparición de nuevos centros de TRA nos ha repercutido favorablemente ya que ha activado la demanda de embriólogos ayudando la incorporación al mercado laboral de los más jóvenes y facilitando la movilidad de los más expertos con ganas de promoción.

El interés de la industria por nuestros laboratorios también se ha incrementado ostensiblemente en los últimos años. Día a día vemos como no cesan de aparecer nuevos productos y equipos que prometen ser la solución para obtener los resultados que todos soñamos. Si bien las circunstancias actuales son beneficiosas ya que existe una mayor oferta y por tanto mayor diversidad para escoger equipos o productos según las preferencias o necesidades de cada laboratorio, esta situación comporta también graves riesgos que requieren prestarle un poco más de atención por nuestra parte.

La utilización de equipos en pruebas que en algunos casos aun no cuentan con las aprobaciones reglamentarias, productos o reactivos que no están autorizados para uso humano o que son catalogados únicamente como “solo para investigación”, y no para uso clínico, nos son ofrecidos ensalzando en ocasiones sus ventajas técnicas y en otras, su mejor precio. En algunos casos, la falta de productos alternativos nos puede condicionar pero siempre que sea posible, deberíamos evitar su utilización si existe otra opción menos arriesgada. Si decidimos usar productos sin marcado CE que es el que acredita que se ha aplicado el sistema de calidad previsto en la normativa europea, o sin la catalogación adecuada, estamos adquiriendo un riesgo importante ya que las responsabilidades legales ante una posible demanda o inspección podrían comportar cuanto menos una sanción administrativa y en caso de pacientes afectados, indemnizaciones importantes. Siempre que sea posible debemos actuar con prudencia evitando correr riesgos innecesarios que no solo pueden ser poco ventajosos para el fin que perseguimos sino que además nos sitúan en una posición de gran vulnerabilidad ante cualquier incidente. Vale la pena recordar que de acuerdo a la legislación vigente, el responsable de una infracción es su autor y cuando la responsabilidad sea compartida, se responderá de forma solidaria compartiendo las sanciones que se impongan.



Simpler IVF procedure

Less stress and better results



Irvine**Scientific**

www.biocareeurope.com
info@biocareeurope.com
+39 06 44 24 0341

 facebook.com/BioCareEurope

 twitter.com/BioCareEurope

 linkedin.com/company/biocare-europe

INFLUENCIA DE LOS EVENTOS CITOCINETICOS EN LA CALIDAD EMBRIONARIA CONVENCIONAL.

THE EMBRYO KINETIC EVENTS INFLUENCE IN THE CONVENTIONAL MORPHOLOGICAL QUALITY.

Nuria Zopeque, Hospital Universitario Reina Sofía. nuria_zop@hotmail.com

Victoria Peña, Hospital Universitario Reina Sofía.

María José Moyano, Hospital Universitario Reina Sofía.

Francisco Prada, Hospital Universitario Reina Sofía.

Juan Lorente, Hospital Universitario Reina Sofía.

Centro de correspondencia: Hospital Universitario Reina Sofía. Av. Menéndez Pidal, s/n, 14004 Córdoba

Resumen: Desde el desarrollo de los sistemas time-lapse (STL) se ha aportado información muy valiosa acerca del desarrollo embrionario, aunque, por el momento no hay evidencias suficientes de que mejore su potencial implantatorio. Nuestro objetivo ha sido comprobar qué parámetros cinéticos se corresponden con embriones de buena calidad morfológica, y como afectan los procesos de división anómalos que se escapan con la observación microscopía convencional. Se evaluaron citocinéticamente 107 embriones a través de un STL con Primovision, al mismo tiempo, se evaluó su calidad morfológica convencional. Los embriones de buena calidad tuvieron tiempos de división más cortos que los de peor calidad. Los intervalos de tiempo T4, T5, T2-3, T3-4, T5-6 son los que mejor relacionaron la buena calidad morfológica. Estos tiempos de división se han asociado a una mayor implantación. Además, en ausencia de un STL, siempre que se transfieran embriones de buena calidad, existe una alta probabilidad de no estar transfiriendo embriones con patrones de división anómala asociados a un bajo potencial implantatorio.

Palabras clave: Cultivo embrionario, time-lapse, división celular.

Abstract: Since the time-lapse systems (TLS) were developed, it has provided useful information about the embryo development, but at the moment there isn't evidence to improve the implantatory potential. Our goal was to determine the kinetics parameters that appear to be related to the best embryo morphology, and the effect of the abnormal cell division that we can't notice with conventional microscopy. We evaluated 107 embryos using a TLS (Primovision) and conventional morphology quality at the same time. We found that cell division of the good quality embryos were shorter and the time lapse T4, T5, T2-3, T3-4, T5-6 were best related with good quality embryo. These cell division times have been associated with greater implantation. Also in the absence of a TLS, if we transfer high quality embryos, there is a high likelihood not to transfer abnormal cell division embryos associated with low implantatory potential.

Keywords: embryo culture, time-lapse, cell division.

INTRODUCCIÓN

El cultivo embrionario es un paso crítico para el correcto desarrollo del embrión, y por tanto es crucial mantener unas condiciones óptimas que permitirá seleccionar uno o dos embriones con el mejor potencial de implantación. La forma más habitual de selección embrionaria se basa en su observación a microscopio óptico durante momentos muy concretos, ya que es necesario reducir el tiempo que los embriones pasan fuera del ambiente controlado del

incubador. El establecimiento de unos criterios de selección adecuados ha sido la causa responsable del incremento del éxito de la fecundación in vitro (Ajduk and Zernicka-Goetz, 2012), además, esta evaluación embrionaria convencional es el indicador general de calidad en la mayoría de los laboratorios de reproducción (Neuber *et al.*, 2006; Kupka *et al.*, 2014). Sin embargo, no es un reflejo del desarrollo dinámico de los mismos, por lo que no es representativo del desarrollo global del embrión (Cruz *et al.*, 2011).

El desarrollo tecnológico está permitiendo que muchas prácticas en los laboratorios de reproducción asistida se estén automatizando, entre ellas, está el nuevo sistema de cultivo embrionario a través de sistemas time-lapse (STL) que permite la evaluación del desarrollo embrionario dentro del incubador, con la ventaja de que evita someter a los embriones a cambios de temperatura y pH. No obstante, las exposiciones prolongadas de luz pueden ejercer un efecto adverso en su desarrollo y calidad (Oh *et al.*, 2007). A diferencia de lo que

ocurre con la microscopía estándar, esta herramienta permite una observación continua del desarrollo embrionario con una evaluación detallada de los eventos que forman parte del desarrollo preimplantatorio. Por otra parte, nos permite detectar eventos anormales en la división que con el cultivo convencional no se observan como: divisiones asimétricas, formación y reabsorción de fragmentos, aparición y desaparición de multinucleación, divisiones directas de una a tres células, etc.

La correlación entre la morfología y la viabilidad embrionaria está bien documentada a través de múltiples estudios que lo respaldan (Finn *et al.*, 2010; Meseguer *et al.*, 2012). Sin embargo, estas tasas continúan siendo relativamente bajas, con una tasa de embarazo clínico alrededor del 30%. La principal cuestión, es si los STL podrán aportar un mayor conocimiento que permita aumentar estas tasas de embarazo. Hasta la fecha, se han creado dos corrientes a la hora de evaluar la validez de los STL, una de ellas, es si mejora la evolución embrionaria y por tanto la tasa de embarazo y la otra, si la evolución citocinética aporta nuevos parámetros a la hora de seleccionar embriones para conseguir un mayor éxito reproductivo. Algunos grupos han obtenido en sus estudios información muy valiosa que ha permitido proponer algoritmos para predecir la viabilidad del embrión (Wong *et al.*, 2010; Meseguer *et al.*, 2011; Campbell *et al.*, 2013; Basile *et al.*, 2014). Además, diversos trabajos defienden que la tasa de embarazo se ve favorecida con el uso de estos sistemas (Meseguer *et al.*, 2012; Rubio *et al.*, 2014), sin embargo, otros autores defienden que no existen diferencias (Cruz *et al.*, 2011; Kirkegaard *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2015). Por otro lado, otros autores defienden que la tasa de aborto es mayor en embriones seleccionados a través de time lapse (Park *et al.*, 2015). Una posible explicación, es que la selección a través de criterios convencionales es más difícil a través del sistema de imagen que proporciona esta tecnología. Existe por tanto, un dilema sobre el beneficio de estos STL, por lo que es importante encontrar un

equilibrio entre la necesidad de evaluar el desarrollo embrionario y la necesidad de limitar la manipulación, evitando la exposición a condiciones subóptimas.

Debido a que no todos los laboratorios de reproducción asistida han podido implantar esta tecnología a su rutina de trabajo, vemos necesaria una aproximación de las dos corrientes de selección embrionaria. En nuestro trabajo hemos querido comprobar, qué parámetros cinéticos se corresponden con embriones de buena calidad morfológica convencional, y cómo influyen a la morfología embrionaria los procesos de división anómalos que se escapan con la microscopía convencional.

OBJETIVOS

1. Análisis de las divisiones embrionarias a través de un sistema time-lapse con primovision.
2. Relación de los ritmos de división y de los eventos aberrantes en la división embrionaria con la calidad morfológica convencional.
3. Relación de los embriones con embarazo positivo con la calidad morfológica convencional y los ritmos citocinéticos de división.

MATERIAL Y METODOS

Se trata de un estudio prospectivo basado en el análisis de 107 embriones procedentes de 20 parejas, entre Septiembre de 2015 y Marzo de 2016. Los ovocitos fueron fecundados a través de inyección intracitoplasmática (ICSI) en parejas con factor masculino, o por fecundación in vitro convencional (FIV) en aquellas con factor femenino o esterilidad de origen desconocido (EOD). Los criterios de exclusión fueron mujeres mayores de 38 años.

Cultivo y evaluación embrionaria

Tras la microinyección de los ovocitos en estadio de metafase II se trasladaron a la placa de cultivo especial para Primovision, que albergan un máximo de 9 pocillos, por lo que aquellos pacientes con más de 9 ovocitos

microinyectados fueron excluidos del estudio. El medio de cultivo utilizado fue G1 Plus (Vitrolife, serie G5). Los cúmulos ovocitarios destinados a FIV se incluyeron en placas con medio IVF Plus (Vitrolife, serie G5) y Ovoil (Vitrolife), con una concentración de 50.000 espermatozoides por ovocito, a las 18-20 horas se evaluó su fecundación. Los ovocitos fecundados se trasladaron a la placa de cultivo Primovision con G1 Plus (Vitrolife, serie G5).

Los embriones fueron evaluados de dos formas, atendiendo a criterios citocinéticos y morfológicos, cada una de ellas por un embriólogo diferente.

Evaluación de la cinética embrionaria

Los ovocitos fecundados fueron analizados a través del STL con Primovision. Se evaluaron diferentes tiempos: tiempo de extrusión del segundo corpúsculo polar, (T2CP), tiempo de aparición de los pronúcleos (T2PN), tiempo de desaparición de los dos pronúcleos (TdPN), tiempo de dos blastómeras (T2), tiempo de tres blastómeras (T3), tiempo de cuatro blastómeras (T4), tiempo de cinco blastómeras (T5), tiempo de seis blastómeras (T6), duración de la primera, segunda, tercera, cuarta y quinta citocinesis (Durc1, Durc2, Durc3, Durc4, Durc5), intervalo de tiempo del paso de dos a tres blastómeras (T2-3), de tres a cuatro blastómeras (T3-4), de cuatro a cinco blastómeras (T4-5) y de cinco a seis blastómeras (T5-6).

Además, se anotaron las divisiones anómalas de 1 a 3 blastómeras (Div3), multinucleación y redistribución celular (que incluye intentos de división en los que se invagina la membrana, pero no finaliza la citocinesis y fusión de dos o más células).

Evaluación morfológica

Se evaluaron los embriones morfológicamente siguiendo las recomendaciones de la nueva clasificación de ASEBIR. La observación del estado embrionario se llevó a cabo a través de la visualización en el modo in vivo que proporciona el sistema Primovision, sin ser sacados en ningún

momento de la incubadora. Se evaluó la fecundación a las 19 horas de realizar la ICSI/FIV, a las 44 se evaluó el día dos (D+2) y a las 68 horas el día tres (D+3). La catalogación embrionaria fue A y B (buena calidad), C (calidad regular) y D (mala calidad). Los embriones que se bloquearon o degeneraron fueron incluidos en la categoría E.

Transferencia embrionaria y resultados clínicos

La transferencia embrionaria se realizó en el día 3 siguiendo los criterios morfológicos convencionales. En los casos en la calidad fue similar, la evolución citocinética sirvió de apoyo para seleccionar los embriones a transferir. En todos los casos se transfirieron 2 embriones. Se consideró embarazo positivo cuando la beta-hCG fue mayor de 60 mU/ml a los 14 días de la transferencia.

Análisis estadístico

Se realizó el test Chi cuadrado para la comparación entre grupos con variables cualitativas y para las variables continuas el test t de Student, asumiendo un nivel de confianza del 95% (error alfa < 0.05), tras comprobar la normalidad con el test de Kolmogorof Smirnov con nivel de significación $p > 0.05$.

Distribuimos las diferentes calidades morfológicas en distintos intervalos de tiempo. Los tiempos analizados fueron convertidos de variables continuas a variables categóricas, dividiéndolos en grupos basados en sus cuartiles, así, en cada cuartil se obtuvo un intervalo de tiempo en el que se distribuyeron el mismo número de embriones. A continuación, se eligieron los dos cuartiles en el que los embriones de buena calidad A superaban el 50%. Adicionalmente, se creó una variable binaria definida con el valor dentro, para aquellos embriones dentro del intervalo compuesto por los dos cuartiles de mayor número de embriones de buena calidad A, y el valor fuera, para aquellos que se encontraban dentro de este intervalo. Una vez obtenidos los dos grupos, se comprobó la frecuencia de las diferentes categorías embrionarias A/B, C o D/E en los dos grupos dentro y fuera. Para ver si las diferencias fueron

significativas, se compararon a través del test Chi-cuadrado de Pearson, asumiendo un nivel de confianza del 95% (error alfa < 0.05).

Todo el análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 17.0

RESULTADOS

La media de edad fue de 34.11 años (± 3.2). La tasa de embarazo por ciclo iniciado fue 20%. Entre los embriones fecundados por FIV e ICSI no existieron diferencias significativas en los tiempos analizados, a excepción del TdPN que en FIV fue mayor (27.8 horas) que en ICSI (25.6 horas) $p = 0.015$.

La media de los tiempos analizados por STL, según las diferentes calidades embrionarias a nivel morfológico según ASEBIR, se expresa en la Tabla I:

Los intervalos óptimos de tiempo más relevantes, que proporcionan una clara asociación entre los ritmos de división y la morfología embrionaria, fueron los estadios celulares T4 entre las 33.41-41.13 horas, T5 entre las 45.40-56.33 horas y los intervalos de tiempo entre T2-3 entre las 9.91-12.25 horas, T3-4 entre las 0-1.14 horas, T4-5 entre las 11.39-16.08 horas y T5-6 entre las 0-1.80 horas (Figura 1). En T6 entre las 48.53-54.80 no se observó dicha relación, ya que al agrupar los embriones de buena calidad (A+B) se observó un mayor porcentaje de éstos fuera del intervalo.

En cuanto a los embriones transferidos, un 66% fueron embriones de buena calidad (A+B), un 28.1% de calidad regular (C) y un 6.25% de mala calidad (D). De ellos, los que finalmente resultaron con un embarazo positivo fueron, un 87.5% de buena calidad y un 12.5% de calidad regular. Seguidamente comprobamos, si estos embriones transferidos que habían dado embarazo estaban dentro de los intervalos óptimos de buena calidad embrionaria más relevantes expuestos anteriormente. Especialmente en el tiempo de 2 a 3 células (33.46-41.13 horas) y de 4 a 5 células (11.39-16.8 horas) el 100% de los embriones estaban dentro de dicho intervalo (Figura 2).

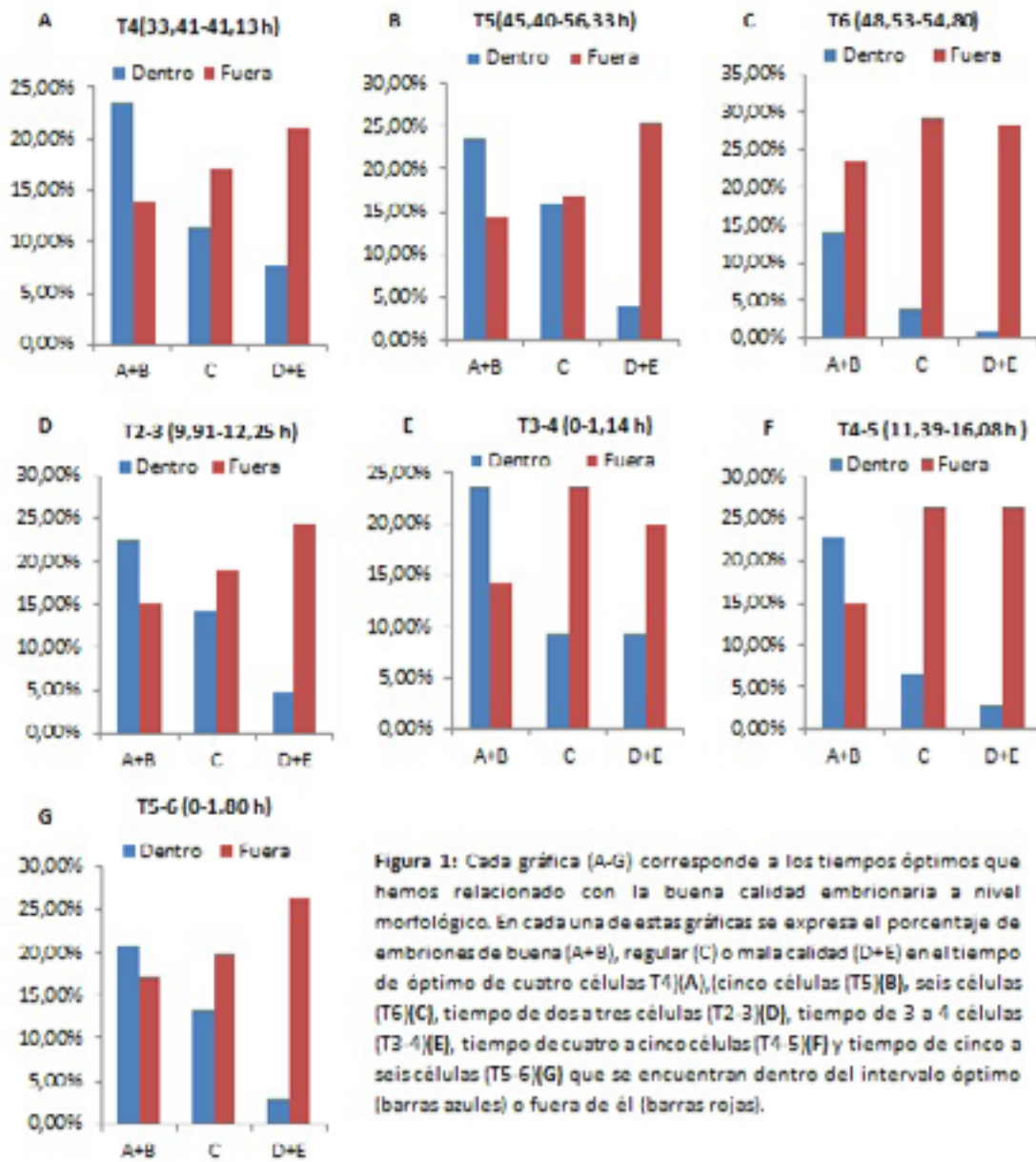
DISCUSIÓN

Una de las principales ventajas, tras la aparición de los sistemas time-lapse, es que evitamos la exposición de los embriones a condiciones subóptimas de temperatura y pH, por lo que la principal hipótesis es que mejora la evolución embrionaria y por tanto el potencial implantatorio. Sin embargo, en nuestro trabajo la tasa de embarazo (20%) sufrió una disminución con respecto al resto de ciclos con embriones cultivados de manera convencional (38.57%). Esto podría explicarse, debido a que una de las principales limitaciones que tienen estos STL es la imposibilidad de girar el embrión durante su evaluación, ya que debido a su aspecto tridimensional, algunas estructuras y/o características requieren de otro plano para su mejor visualización (Kaser and Racowsky, 2014), y por tanto, se podrían haber escapado características de mal pronóstico como la multinucleación.

La media de los tiempos de división analizados fue significativamente menor en los embriones de buena calidad A+B que en el resto de calidades inferiores, a excepción del tiempo de T2PN, T3 y T4-5. En relación a los intervalos de tiempo, los estadios mejor definidos en cuanto a buena calidad morfológica fueron T4 y T5, y los tiempos de división entre T2-3, T3-4, T4-5 y T5-6, ya que fueron los que mayor probabilidad tienen de dar lugar a embriones de buena calidad. Cuando comparamos estos intervalos con los encontrados en la literatura, observamos similitudes con autores como Messeguer et al, que asociaron T5 en un rango óptimo de 48.8-56.6 horas, T2-3 ≤ 11.9 y T3-4 ≤ 0.76 (Messeguer et al., 2011). Estos autores encontraron que los embriones dentro de estos intervalos tienen al menos un 10% más de probabilidad de implantar. Otros como VerMilyea et al., también asociaron T2-3 (9.33-11.45 horas) y T3-4 (≤ 1.73 horas) a una mayor probabilidad de implantación (VerMilyea et al., 2014). También coincidimos con los intervalos de tiempo de T4, T5, T2-3 y T3-4 con otras publicaciones (Cruz et al., 2011; Conaghan et al., 2013), aunque estos autores solo pudieron predecir el desarrollo a blastocisto y no encontraron relación con la capacidad de implantación.

	A+B	C	D+E	p
T2CP	3,67 ± 1.09	4,96 ± 2.16	5,42 ± 3.28	0,021 *
T2PN	11,89 ± 2.15	12,47 ± 2.45	13,63 ± 3.28	0,077
TdPN	24,78 ± 2.82	26,74 ± 4.35	28,05 ± 4.85	0,004*
T2	27,49 ± 2.53	29,21 ± 5.34	31,05 ± 5.12	0,006*
T3	37,82 ± 3.09	38,27 ± 6.21	40,33 ± 5.75	0,158
T4	39,77 ± 3.44	40,66 ± 5.49	45,10 ± 8.09	0,001*
T5	50,68 ± 5.66	48,99 ± 8.47	56,74 ± 10.70	0,003*
T6	53,62 ± 5.10	54,32 ± 9.18	68,64 ± 13.34	0,077
Durc1	0,63 ± 0.85	1,04 ± 1.97	0,66 ± 0.97	0,004*
Durc2	0,66 ± 1.45	0,69 ± 0.78	0,91 ± 1.15	0,003*
Durc3	0,53 ± 0.46	0,813 ± 1.99	0,75 ± 0.55	0,046*
Durc4	0,45 ± 0.95	1,32 ± 3.09	1,83 ± 5.10	0*
Durc5	0,23 ± 0.19	1,96 ± 6.83	0,85 ± 0.71	0*
Durc6	0,28 ± 0.35	0,71 ± 1.74	0,38 ± 0.52	0*
T2-3	9,68 ± 3.27	9,67 ± 4.53	10,44 ± 3.60	0*
T3-4	2,06 ± 3.28	3,23 ± 3.71	5,11 ± 6.86	0,006*
T4-5	10,65 ± 4.67	8,25 ± 6.16	11,63 ± 10.13	0,158
T5-6	2,50 ± 3.98	6,45 ± 7.87	7,59 ± 8.29	0,001*

Tabla I: Media de los tiempos analizados en función de la calidad embrionaria a nivel morfológico. T2CP (Extrusión del segundo corpúsculo polar), T2PN (Tiempo de aparición del segundo pronúcleo), TdPN (Tiempo de desaparición de los dos pronúcleos), T2 (Tiempo de dos células), T3 (Tiempo de tres células), T4 (Tiempo de cuatro células), T5 (Tiempo de cinco células), T6 (Tiempo de seis células), Durc1 (Duración de la primera citocinesis), Durc2 (Duración de la segunda citocinesis), Durc3 (Duración de la tercera citocinesis), Durc4 (Duración de la cuarta citocinesis), Durc5 (Duración de la quinta citocinesis), Durc6 (Duración de la sexta citocinesis), T2-3 (Tiempo de dos a tres células), T3-4 (Tiempo de tres a cuatro células), T4-5 (Tiempo de cuatro a cinco células), T5-6 (Tiempo de cinco a seis células). * Nivel de significación $p < 0.05$



■ % EMBRIONES DENTRO DEL INTERVALO ÓPTIMO
 ■ % EMBRIONES FUERA DEL INTERVALO ÓPTIMO

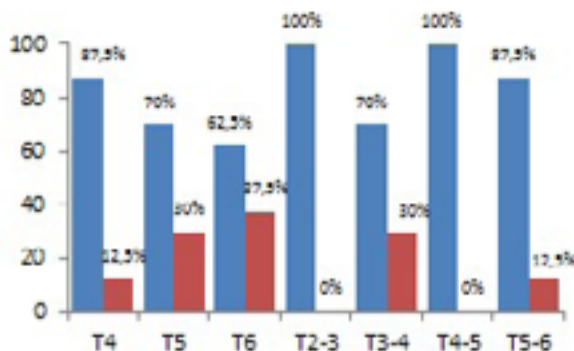


Figura 2: Las barras azules representan el porcentaje de embriones con embarazo positivo dentro de los intervalos de tiempo óptimo de buena calidad morfológica, y las barras rojas el porcentaje de embriones que se encuentran fuera de dicho intervalo óptimo. T4 (Tiempo de cuatro células), T5 (Tiempo de cinco células), T6 (Tiempo de seis células), T2-3 (Tiempo de dos a tres células), T3-4 (Tiempo de tres a cuatro células), T4-5 (Tiempo de cuatro a cinco células), T5-6 (Tiempo de cinco a seis células).

Por otro lado, existe controversia acerca de si la división temprana, entre las 25 y 27 horas post ICSI, mejora las tasas de embarazo, ya que hay autores que lo defienden (Shoukir *et al.*, 1997; Sakkas *et al.*, 1998; Ciray *et al.*, 2005) y otros que no confirman esta relación (Emiliani *et al.*, 2006; Sundstrom and Saldeen, 2008; de los Santos *et al.*, 2014). En nuestro estudio, hemos podido comprobar que en embriones de mejor calidad (A+B) la primera citocinesis se produce entre 2 y 4 horas antes que en el resto de los embriones de peor calidad, con una media de 26.9 ± 2.7 horas, pero al analizar los intervalos de tiempo no encontramos relación entre la calidad embrionaria y la división temprana.

Otro aspecto importante a evaluar fue la sincronía celular, ya que diversos estudios citan que la falta de sincronía se asocia con una disminución en la capacidad implantatoria (Steer *et al.*, 1992; Van Blerkom and Henry, 1992; De

El tiempo de paso a los estadios intermedios de 3 y de 5 blastómeras lo hemos evaluado con los parámetros de T2-3 y T4-5. No encontramos una relación entre las calidades morfológicas y la media de tiempo que transcurre entre T4-5, sin embargo, cuando analizamos los intervalos de tiempo existe una clara asociación, ya que los embriones que pasan de 4 a 5 células entre las 11.39-16.08 horas tendrán un 18% más de probabilidad de tener calidad A+B que tener calidad D+E. El hecho de que la media de T4-5 no fuera significativa puede ser debido a la alta desviación estándar de las medias, por tanto, se podría deducir que la calidad embrionaria depende de un intervalo determinado de tiempo más amplio en T4-5, que cuando es diferente implica una peor calidad embrionaria.

En relación con los comportamientos aberrantes durante la división, algunos autores indican que aproximadamente

a una mayor implantación, podemos concluir una vez más la clara relación entre la buena calidad morfológica y la probabilidad de implantación. También, podemos concluir que en ausencia de un STL, siempre que se transfieran embriones de buena calidad A o B, con una alta probabilidad no se transferirán embriones de estas características asociadas a un bajo potencial implantatorio como; división de una a tres células, fusión celular o intentos de división fallidos.

A pesar de ello, existen pocos datos que indiquen una clara efectividad del uso del time-lapse con respecto a la capacidad implantatoria (Kaser and Racowsky, 2014), por lo que es necesario avanzar en la investigación de la citocinética embrionaria para poder afianzar que parámetros proporcionan la mejor información en cuanto al potencial de implantación, de ahí, que la evaluación morfológica convencional siga siendo

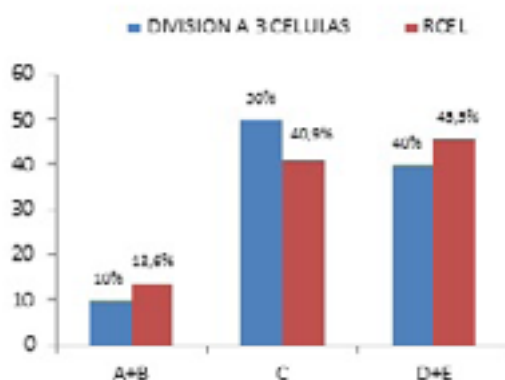


Figura 3: Se representa el porcentaje de embriones de buena (A+B), regular (C) o mala calidad (D+E) de aquellos embriones en los que alguna de sus blastómeras tuvieron división directa a tres células (barras azules) o redistribución celular (RCEL) (barras rojas), ambas diferencias fueron significativas con una $p = 0.017$ y $p = 0.26$ respectivamente.

Placido *et al.*, 2002; Hnida *et al.*, 2004; Kirkegaard *et al.*, 2012). En un embrión con divisiones sincrónicas la aparición de 2, 4 y 8 células tendrá un mínimo periodo de tiempo entre los estadios intermedios de 3, 5 y 7 células, siendo además el tamaño celular similar entre ellas. En nuestro estudio hemos evaluado la sincronía analizando los intervalos de tiempo entre T3-4, y observamos que aquellos embriones de buena calidad tardan 1.17 horas menos que los de calidad C, y 3.05 horas menos que los embriones de mala calidad D+E en pasar de 3 a 4 células. Además, en el análisis de intervalos de tiempo observamos como los embriones que tardan entre 0 y 1.14 horas en pasar de 3 a 4 células tendrán mayor probabilidad de ser embriones de buena calidad.

el 1% de los embriones que presentan alguna anomalía logran implantarse (Hlinka *et al.*, 2012; Rubio *et al.*, 2014). En nuestro trabajo observamos que los embriones con división a tres células y con redistribución celular son de peor calidad, ya que solo un 10% y un 13.6% de ellos respectivamente, consiguen ser de calidad A o B. Además, un escaso porcentaje de ellos se dividió dentro de los tiempos establecidos como predictores de buena calidad.

Teniendo en cuenta, que de los embriones transferidos que dieron embarazo, el 87,5% de ellos eran de buena calidad A o B y que el mayor porcentaje de éstos se dividieron dentro de nuestros intervalos óptimos de buena calidad, que al mismo tiempo, otros autores han asociado

el Gold standard en la catalogación embrionaria.

BIBLIOGRAFIA

Ajduk, A. and M. Zernicka-Goetz. *Advances in embryo selection methods*. F1000 Biol Rep 2012; 4: 11.

Basile, N., C. Nogales Mdel, F. Bronet, M. Florensa, M. Riqueiros, L. Rodrigo, et al. *Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis*. Fertil Steril 2014; 101(3): 699-704.

Campbell, A., S. Fishel, N. Bowman, S. Duffy, M. Sedler and C. F. Hickman. *Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics*.

- Reprod Biomed Online 2013; 26(5): 477-485.
- Ciray, H. N., L. Karagenc, U. Ulug, F. Bener and M. Bahceci. Use of both early cleavage and day 2 mononucleation to predict embryos with high implantation potential in intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2005; 84(5): 1411-1416.
- Conaghan, J., A. A. Chen, S. P. Willman, K. Ivani, P. E. Chenette, R. Boostanfar, et al. Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial. *Fertil Steril* 2013; 100(2): 412-419 e415.
- Cruz, M., B. Gadea, N. Garrido, K. S. Pedersen, M. Martinez, I. Perez-Cano, et al. Embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging. *J Assist Reprod Genet* 2011; 28(7): 569-573.
- de los Santos, M. J., G. Arroyo, A. Busquet, G. Calderon, J. Cuadros, M. V. Hurtado de Mendoza, et al. A multicenter prospective study to assess the effect of early cleavage on embryo quality, implantation, and live-birth rate. *Fertil Steril* 2014; 101(4): 981-987.
- De Placido, G., M. Wilding, I. Stina, A. Mollo, E. Alviggi, A. Tolino, et al. The effect of ease of transfer and type of catheter used on pregnancy and implantation rates in an IVF program. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19(1): 14-18.
- Emiliani, S., G. Fasano, B. Vandamme, A. S. Vannin, M. Verdoodt, J. Biramane, et al. Impact of the assessment of early cleavage in a single embryo transfer policy. *Reprod Biomed Online* 2006; 13(2): 255-260.
- Finn, A., L. Scott, T. O'Leary, D. Davies and J. Hill. Sequential embryo scoring as a predictor of aneuploidy in poor-prognosis patients. *Reprod Biomed Online* 2010; 21(3): 381-390.
- Hlinka, D., B. Kalatova, I. Uhrinova, S. Dolinska, J. Rutarova, J. Rezacova, et al. Time-lapse cleavage rating predicts human embryo viability. *Physiol Res* 2012; 61(5): 513-525.
- Hnida, C., E. Engenheiro and S. Ziebe. Computer-controlled, multilevel, morphometric analysis of blastomere size as biomarker of fragmentation and multinuclearity in human embryos. *Hum Reprod* 2004; 19(2): 288-293.
- Kaser, D. J. and C. Racowsky. Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2014; 20(5): 617-631.
- Kirkegaard, K., J. J. Hindkjaer, M. L. Grondahl, U. S. Kesmodel and H. J. Ingerslev. A randomized clinical trial comparing embryo culture in a conventional incubator with a time-lapse incubator. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29(6): 565-572.
- Kupka, M. S., A. P. Ferraretti, J. de Mouzon, K. Erb, T. D'Hooghe, J. A. Castilla, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHREdagger. *Hum Reprod* 2014; 29(10): 2099-2113.
- Meseguer, M., J. Herrero, A. Tejera, K. M. Hilligsoe, N. B. Ramsing and J. Remohi. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* 2011; 26(10): 2658-2671.
- Meseguer, M., I. Rubio, M. Cruz, N. Basile, J. Marcos and A. Requena. Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertil Steril* 2012; 98(6): 1481-1489 e1410.
- Neuber, E., N. G. Mahutte, A. Arici and D. Sakkas. Sequential embryo assessment outperforms investigator-driven morphological assessment at selecting a good quality blastocyst. *Fertil Steril* 2006; 85(3): 794-796.
- Oh, S. J., S. P. Gong, S. T. Lee, E. J. Lee and J. M. Lim. Light intensity and wavelength during embryo manipulation are important factors for maintaining viability of preimplantation embryos in vitro. *Fertil Steril* 2007; 88(4 Suppl): 1150-1157.
- Park, H., C. Bergh, U. Selleskog, A. Thurin-Kjellberg and K. Lundin. No benefit of culturing embryos in a closed system compared with a conventional incubator in terms of number of good quality embryos: results from an RCT. *Hum Reprod* 2015; 30(2): 268-275.
- Rubio, I., A. Galan, Z. Larreategui, F. Ayerdi, J. Bellver, J. Herrero, et al. Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope. *Fertil Steril* 2014; 102(5): 1287-1294 e1285.
- Sakkas, D., Y. Shoukir, D. Chardonnes, P. G. Bianchi and A. Campana. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum Reprod* 1998; 13(1): 182-187.
- Shoukir, Y., A. Campana, T. Farley and D. Sakkas. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod* 1997; 12(7): 1531-1536.
- Steer, C. V., C. L. Mills, S. L. Tan, S. Campbell and R. G. Edwards. The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme. *Hum Reprod* 1992; 7(1): 117-119.
- Sundstrom, P. and P. Saldeen. Early embryo cleavage and day 2 mononucleation after intracytoplasmic sperm injection for predicting embryo implantation potential in single embryo transfer cycles. *Fertil Steril* 2008; 89(2): 475-477.
- Van Blerkom, J. and G. Henry. Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. *Hum Reprod* 1992; 7(3): 379-390.
- VerMilyea, M. D., L. Tan, J. T. Anthony, J. Conaghan, K. Ivani, M. Gvakharia, et al. Computer-automated time-lapse analysis results correlate with embryo implantation and clinical pregnancy: a blinded, multicentre study. *Reprod Biomed Online* 2014; 29(6): 729-736.
- Wong, C. C., K. E. Loewke, N. L. Bossert, B. Behr, C. J. De Jonge, T. M. Baer, et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol* 2010; 28(10): 1115-1121.

CONTROL DE CALIDAD EXTERNO DEL LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA CLÍNICA

Parámetros sometidos a examen: Casos virtuales de pacientes con embriones
D+2 a D+5 en los que se evaluará:
- Características morfológicas
- Clasificación y decisión clínica*
Comprobación de toxicidad de medios y material.

Características específicas: Duración: 1 año.
Nº Especímenes: vídeo y material esterilizado.

Envío de muestra: Uno.

Envío documentación: Uno.

Envío de datos: Vía página web.

Informes: Valoración por consenso de laboratorios
Valoración por consenso de grupo de expertos

Proceso de datos: Informatizado.

<http://controldecalidad.asebir.com/>

*Según criterios ASEBIR de valoración 2015

Con la colaboración de:

Ceifer

VITRIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES

SPERM VITRIFICATION

Rubén Dasí Crespo, Jose Descals Ferrando, Juan Manuel Moreno-Moya, Carla Olmedo Illueca, Iris Martínez Rodero, Irene Cuevas Saiz
Hospital General Universitario de Valencia
Correspondencia: rdasicrsp@gmail.com

Resumen: La vitrificación de espermatozoides es un método de criopreservación ultra rápida que consiste en la exposición directa a nitrógeno líquido. De este modo, se evita la cristalización del agua intracelular y el criodañó, sin emplear crioprotectores permeables que pueden implicar riesgo mutagénico. Se realiza en espermatozoides obtenidos por métodos de selección espermática, lo que garantiza una alta motilidad, y al estar desprovistos de plasma seminal, disminuye el riesgo de transmisión de infecciones virales y bacterianas. Por tanto, los objetivos del presente trabajo de revisión son: en primer lugar, comparar los resultados de esta técnica sobre los parámetros espermáticos respecto a la congelación convencional (motilidad, viabilidad, integridad acrosómica, integridad de membrana plasmática, fragmentación de ADN, criocapacitación y potencial de membrana mitocondrial) y, en segundo lugar, establecer un protocolo detallado del proceso. Para ello, nos enfocaremos en el fundamento de cada uno de los pasos (empleo de medios y efecto de la temperatura), así como en los casos clínicos que confirman el éxito de esta técnica.

Palabras clave: Vitrificación, congelación, criopreservación, espermatozoide, nitrógeno, parámetros espermáticos.

Abstract: Vitrification is an ultrafast sperm cryopreservation method consisting of direct exposure to liquid nitrogen. Thus, crystallization of intracellular water and criodamage is avoided, without employing permeable cryoprotectants which are considered as potentially mutagenic. The sperm sample used has previously been subjected to methods for sperm selection, which ensures high motility, and in absence of seminal plasma, which reduces the risk of transmission of viral and bacterial infections. Therefore, the objectives are: first, to study the sperm parameters from samples using this technique compared to those criopreserved by conventional freezing method (motility, viability, acrosome integrity, plasma membrane integrity, DNA fragmentation, cryocapacitation and mitochondrial membrane potential); second, to establish a standardized operating procedure. To do this, we analyzed the foundation of each of the steps (use of media and temperature effect), and clinical cases that confirm the success of this technique.

Keywords: vitrification, freezing, criopreservation, sperm, nitrogen, spermatoc parameters.

INTRODUCCIÓN

Una de las técnicas complementarias en reproducción asistida es la criopreservación, que hace posible almacenar los gametos y preembriones con el objetivo principal de mantener su viabilidad y funcionalidad.

La congelación convencional provoca un importante daño físico-químico en las estructuras intracelulares, incluyendo: aumento de la peroxidación lipídica de la membrana, descenso de la velocidad, motilidad, morfología, viabilidad y actividad mitocondrial e inducción de varios procesos asociados a la muerte celular (O'Connell et al., 2002). Para eliminar la formación de cristales de hielo, los crioprotectores permeables

(glicerol, propilenglicol, etilenglicol o dimetilsulfóxido) se utilizan en la criopreservación celular. No obstante, éstos pueden inducir estrés letal debido a la formación de cristales de hielo, lo que se conoce como "efecto soluto", y repercusiones genéticas inherentes a la toxicidad química (Gilmore et al., 1997).

La primera referencia a la vitrificación de espermatozoides data de 1938 (Luyet & Hoddap, 1938) con unos resultados de muy baja o nula supervivencia, ya que las velocidades críticas de enfriamiento eran imposibles de conseguir. La reducción del uso tanto de crioprotectores permeables como no permeables se sugirió como alternativa (Nawroth et al., 2002) debido a la

baja tolerancia de estas células a las elevadas concentraciones de los crioprotectores permeables citotóxicos (Gilmore et al., 1997; Isachenko et al., 2003), y posteriormente se propusieron cuatro técnicas diferentes de vitrificación espermática (Isachenko et al., 2005). Tras esto, la vitrificación tuvo éxito al sumergir directamente la dilución espermática en nitrógeno líquido (LN₂) con bajas concentraciones de crioprotectores no permeables (Isachenko et al., 2008; Sánchez et al., 2012).

La vitrificación preserva adecuadamente la funcionalidad espermática con una alta motilidad, baja criocapacitación, elevado potencial de membrana mitocondrial, baja fragmentación

de ADN, conservación acrosómica y elevada integridad de membrana en comparación a la congelación convencional (Isachenko et al., 2012a), además de ofrecer la ventaja de proteger al espermatozoide de las lesiones inherentes a la criopreservación (Meseguer et al., 2004) y, en particular, de los efectos mutagénicos de los crioprotectores permeables (Fraga et al., 1991). Este método, basado en la congelación ultra rápida ($2000^{\circ}\text{C min}^{-1}$), permite que el agua pase a un estado vítreo por un incremento extremo de la viscosidad donde la solidificación ocurre a bajas temperaturas sin la formación de cristales y sin la necesidad de añadir plasma seminal o crioprotectores permeables. Dado que el espermatozoide contiene gran cantidad de proteínas, azúcares y otros componentes, la matriz intracelular, altamente viscosa y compartimentada, actúa como un crioprotector natural (Isachenko et al., 2011, 2012a). El espermatozoide, libre de plasma seminal y con función conservada puede ser utilizado de inmediato tras la descongelación para cualquier técnica de medicina reproductiva, en volúmenes pequeños (1-5 μL) para fecundación *in vitro* convencional e inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) (Isachenko et al., 2012b), o en volúmenes mayores para inseminación intrauterina (IUI) (100-500 μL) (Isachenko et al., 2011). Este nuevo método otorga a pacientes oligoastenozoospermicos severos una alternativa terapéutica de bajo coste, previo a las técnicas de fecundación *in vitro*, ya que permite almacenar espermatozoides seleccionados hasta obtener la concentración adecuada mediante acumulación de pajuelas (Figura 5) para realizar ciclos de IUI (Sánchez et al., 2012).

MATERIAL Y MÉTODOS

La búsqueda de esta revisión bibliográfica se ha realizado mediante la base de datos Pubmed, las revistas Fertility & Sterility y Human Reproduction, así como Google académico, con artículos comprendidos entre los diez últimos años, de 2006 a 2016. Las palabras clave usadas en la búsqueda bibliográfica son las

siguientes: vitrificación, congelación, criopreservación, espermatozoide, nitrógeno, parámetros espermáticos.

PARÁMETROS ESPERMÁTICOS

Motilidad

La motilidad de los espermatozoides, evaluada mediante cámara Makler y microscopio a 20x aumentos, criopreservados en un volumen de 10 μL y en ausencia de crioprotectores permeables, mostró diferencias significativas al comparar la vitrificación vs. congelación convencional ($28.0\pm 6.0\%$ vs. $18.0\pm 9.2\%$ respectivamente, $p<0.05$; en fresco $35.0\pm 7.5\%$). También se observaron diferencias estadísticamente significativas a las 24 h ($12.0\pm 2.8\%$ vs. $5.0\pm 3.1\%$ respectivamente, $p<0.05$; en fresco $20.0\pm 3.9\%$) y a las 48 h ($6.0\pm 1.0\%$ vs. $0.5\pm 0.02\%$ respectivamente, $p<0.1$; en fresco $10.0\pm 1.9\%$) (Isachenko et al., 2012a). Se ha descrito la vitrificación de espermatozoides en diferentes soportes (cryoloops, droplets y pajuela abierta). Dependiendo del método seleccionado, se han registrado porcentajes de motilidad de hasta el 60% en pacientes normozoospermicos y hasta el 20% en oligoastenoteratozoospermicos (Nawroth et al., 2002; Isachenko et al., 2004a, b, 2005, 2008).

Integridad de la membrana plasmática y viabilidad

Se observó que los valores más elevados de integridad de membrana plasmática, evaluada mediante el kit de viabilidad espermática LIVE/DEAD (Molecular Probes L-7011, Eugene, Oregon), correspondían a los espermatozoides vitrificados en comparación a la congelación convencional ($56.0\pm 5.1\%$ vs. $22.0\pm 3.5\%$ respectivamente, $p<0.05$). No obstante, la disminución de viabilidad espermática en ambos casos fue significativa (en fresco $96.0\pm 0.6\%$, $p<0.05$) (Isachenko et al., 2012a). En un estudio sobre ciclos en los que se emplearon espermatozoides obtenidos a partir de congelación convencional, vitrificación o muestras en fresco, se evaluaron tres parámetros embrionarios: tasa de fecundación (formación de pronúcleos), formación

de preembriones (4-6 blastómeros) y llegada a estadio de blastocisto, sin observarse diferencias estadísticamente significativas ($p<0.01$) (Isachenko et al., 2004b).

Integridad de la membrana acrosómica

El efecto de ambos procedimientos de criopreservación sobre el estado de la membrana acrosómica se evaluó mediante tinción CTC-Hoechst 33258, observando diferencias significativas entre vitrificación y congelación convencional ($55.0\pm 5.8\%$ vs. $21.0\pm 3.8\%$ respectivamente, $p<0.05$; en fresco $84.0\pm 3.1\%$, $p<0.05$) (Isachenko et al., 2012a)

Criocapacitación

La criocapacitación son cambios de membrana evaluables mediante tinción con clorotetraciclina (CTC) similares a la capacitación y asociados a la criopreservación. Aunque produce variaciones en las vías de señalización intracelular del espermatozoide, es importante enfatizar que el término se refiere únicamente a los cambios a nivel funcional, no molecular (Cormier and Bailey, 2003). La vitrificación ofrece un significativo efecto de prevención a la criocapacitación en comparación a la congelación convencional ($8.0\pm 1.1\%$ vs. $9.0\pm 2.2\%$ respectivamente, $p<0.01$; en fresco $2.0\pm 0.3\%$, $p<0.05$). Además, la exposición a bajas temperaturas puede afectar a los mecanismos de señalización que no pueden ser medidos mediante CTC. Son necesarios más estudios con técnicas adicionales más avanzadas para investigar la inducción de cambios más complejos: determinación de vías de señalización, cambios en la estructura lipídica de la membrana, vías reguladas por kinasa/ fosfatasa o una combinación de procesos (Isachenko et al., 2012a).

Potencial de membrana mitocondrial y fragmentación de ADN

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la integridad del ADN en relación con el método de congelación ($p>0.5$), empleando CometAssay Reagent Kit for Single Cell Gel Electrophoresis Assay

(Trevigen, Inc., Gaithersburg, MD). Los porcentajes de los espermatozoides que muestran ADN sin daños fueron 85,09 y 89,51 %, respectivamente, para el espermatozoide fresco tratado o no tratado con el crioprotector, 84,62 y 83,53 % respectivamente, para el espermatozoide congelado con o sin crioprotector, y 87,24 y 84,66 % respectivamente, para el espermatozoide vitrificado con o sin crioprotector. (Isachenko et al., 2004a). Se analizó el potencial de membrana mitocondrial mediante MitoTracker Red CMXRosy (Invitrogen, Eugene, OR, USA) y la fragmentación del ADN mediante APO-DIRECT kit (BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA), y se obtuvieron resultados estadísticamente significativos a favor de la vitrificación vs. congelación convencional: mayor potencial de membrana mitocondrial ($11.98 \pm 4.33\%$ vs. $6.58 \pm 1.03\%$ respectivamente, $p < 0.001$) y menor porcentaje de fragmentación de DNA ($2.79 \pm 1.02\%$ vs. $3.86 \pm 1.38\%$ respectivamente, $p < 0.01$) (Slabbert et al., 2014).

MEDIOS DE VITRIFICACIÓN

Crioprotectores permeables

Se ha evaluado el uso de suplementos de azúcares en la inmersión directa en LN₂: el monosacárido glucosa, el disacárido sacarosa y el trisacárido rafinosa (Koshimoto & Mazur, 2002). Este equipo llegó a la conclusión de que el efecto protector no depende tanto del tipo de azúcar empleado, sino de la concentración molar empleada. Otro grupo analizó la contribución de la glucosa, la sacarosa y la trehalosa como agentes crioprotectores y se obtuvieron los mejores resultados con 0.25 M de sacarosa en HTF (human tubular fluid medium) (Isachenko et al., 2008), con un significativo efecto crioprotector en la motilidad (Figura 1) y la integridad de la membrana mitocondrial (Figura 2). En un estudio de vitrificación mediante Cryotop (empleando el protocolo de Endo et al., 2012a,b) se obtuvieron resultados a favor de no añadir sacarosa. No obstante, en relación a otros estudios anteriores (Isachenko et al., 2004a,b), la fragmentación de ADN en espermatozoides vitrificados

humanos debe oscilar entre 5-10%, y en este estudio la fragmentación supera el 10%, asociado probablemente al uso del Cryotop (Chen et al., 2014).

Adición de butilhidroxitolueno (BHT) al medio de vitrificación

Se ha demostrado el potencial efecto protector del BHT, cuyo mecanismo es la inserción de este antioxidante en la membrana espermática, incrementando su fluidez y previniendo de la adhesión del VIH a los receptores celulares diana. Las concentraciones óptimas de BHT para la criopreservación mediante vitrificación de espermatozoides humanos se encuentra en un rango entre 0.5-1.0 mM, manteniendo un alto potencial de membrana, baja fragmentación de ADN y baja producción de ROS (Figura 4). No obstante, se requieren más estudios que investiguen el efecto del BHT en el medio de criopreservación sobre la interacción espermatozoide-virus y la posibilidad de transmisión del VIH (Merino et al., 2015).

CAMBIOS DE TEMPERATURA

Temperatura de desvitrificación

Se evaluó el efecto de la temperatura de desvitrificación en la motilidad y la funcionalidad de la membrana celular mediante test HOST en espermatozoides humanos vitrificados, concluyendo que la temperatura y el tiempo empleados en la desvitrificación espermática afectan considerablemente al mantenimiento de la funcionalidad de la membrana y la motilidad del espermatozoide. A 42°C y 5s de exposición en el proceso de desvitrificación, el espermatozoide conserva una elevada motilidad y su funcionalidad de membrana intacta (Figura 3). (Mansilla et al., 2016)

Temperatura de almacenamiento

Se analizó el efecto del almacenamiento a -86°C en comparación a los convencionales -196°C (bajo LN₂), y no se encontraron diferencias entre -86°C vs. -196°C respectivamente en: motilidad progresiva (73% vs. 77%), fragmentación de ADN (3.1% vs. 2.9%)

y potencial de membrana mitocondrial (71% vs. 74%) (Sánchez et al., 2012) (Tabla I). Las principales ventajas de eliminar la necesidad de LN₂ son la reducción de costes, tiempo, espacio, esfuerzo invertido en la búsqueda de muestras y un incremento en la seguridad del propio profesional. No obstante, para un almacenamiento más prolongado, se necesitan más estudios al respecto.

CASOS CLÍNICOS

La vitrificación de espermatozoides puede ser utilizada satisfactoriamente para muestras que serán utilizadas en cualquier técnica de reproducción asistida. Los primeros casos de espermatozoides desvitrificados fueron usados para ICSI y dieron lugar a embarazo normal y posterior nacimiento de un bebé sano (Isachenko et al., 2012b). Posteriormente y basándose en estudios previos (Isachenko et al., 2003, 2005, 2008, 2011b, 2012), se modificó el protocolo de vitrificación para investigar la posibilidad de éxito en muestras vitrificadas en un volumen mayor (100 µL) y se obtuvo el primer caso de nacido vivo sano mediante inseminación tras desvitrificación (Sánchez et al., 2012).

CONCLUSIONES

Se ha establecido un protocolo cuyos resultados han sido exitosos tanto en muestras desvitrificadas destinadas a ICSI como a IUI. La vitrificación/desvitrificación de espermatozoides ofrece mejores resultados estadísticamente significativos respecto a la congelación convencional. Los estudios evaluados nos indican que esta técnica ofrece mayores porcentajes de: motilidad, integridad de membrana plasmática como indicador de viabilidad, integridad acrosómica y potencial de membrana mitocondrial. Por otra parte, presenta menor porcentaje de fragmentación del ADN y de criocapacitación, cambios funcionales de membrana similares a la capacitación asociados a la crioconservación.

En conclusión, la vitrificación es una técnica simple, rápida, coste

efectiva y capaz de recuperar una alta proporción de espermatozoides móviles, así como efectiva en la protección de espermatozoides a los agentes mutagénicos de los crioprotectores permeables y los daños inherentes a la crioconservación. No obstante, además del trabajo de Isachenko et al. como principal referente de la vitrificación de espermatozoides, y del protocolo estandarizado de Sánchez et al., son necesarios más estudios que confirmen la seguridad de esta técnica.

BIBLIOGRAFÍA

- Chen Y, Li L, Qian Y, Xu C, Zhu Y, Huang H, et al. Small-volume vitrification for human spermatozoa in the absence of cryoprotectants by using Cryotop. *Andrología* 2015; 47(6):694-9.
- Cormier N, Bailey JL. A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 2003; 69:177-185.
- Endo Y, Fujii Y, Shintani K, Seo M, Motoyama H, Funahashi H. Simple vitrification for small numbers of human spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2012a; 24:301-307.
- Endo Y, Fujii Y, Kurotsuchi S, Motoyama H, Funahashi H. Successful delivery derived from vitrified-warmed spermatozoa from a patient with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2012b; 98:1423-1427.
- Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA, Ames BN. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Nat Acad Sci USA* 1991; 88:11003-6.
- Gilmore JA, Liu J, Gao DY & Critser JK. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. *Hum Reprod* 1997; 12:112-118.
- Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, et al. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reprod Biomed Online* 2003; 6:191-200.
- Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, Rahimi G, Schondorf T, Mallmann P, et al. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Hum Reprod* 2004a; 19:932-9.
- Isachenko V, Isachenko E, Katkov II, Montag M, Dessole S, Nawroth F, van der Ven H. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. *Biol Reprod* 2004b; 71:1167-1173.
- Isachenko V, Isachenko E, Montag M, Zaeva V, Krivokharchenko A, Nawroth F, Dessole S, Katkov I & van der Ven H. Clean technique for cryoprotectant - free vitrification of human spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2005; 10:350-354.
- Isachenko E, Isachenko V, Weiss JM, Kreienberg R, Katkov II, Schulz M, Lulat AG, Risopatrón MJ, 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, Sanchez R, Risopatrón J, Damjanoski I, Isachenko E. Cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa in large (to 0.5 mL) volume: novel technology. *Clin Lab J* 2011; 57:643-650.
- Isachenko V, Maettner R, Petrunkina AM, Sterzik K, Mallmann P, Rahimi G, Sanchez R, Risopatrón J, Damjanoski I, Isachenko E. Vitrification of human ICSI/IVF spermatozoa without cryoprotectants: new capillary technology. *J Androl* 2012a; 33:462-468.
- Isachenko V, Isachenko E, Petrunkina A, Sanchez R. Human spermatozoa vitrified in the absence of permeable cryoprotectants: birth of two healthy babies. *Reprod Fert Develop* 2012b; 24:323-6.
- Luyet BJ, Hoddap A. Revival of frog's spermatozoa vitrified in liquid air. *Proceedings of the Meeting of Society for Experimental Biology* 1938; 39:433-434.
- Koshimoto C, Mazur P. The effect of the osmolality of sugarcontaining media, the type of sugar, and the mass and molar concentration of sugar on the survival of froze-thawed mouse sperm. *Cryobiology* 2002; 45:80-90.
- Mansilla MA, Merino O, Risopatrón J, Isachenko V, Isachenko E, Sánchez R. High temperature is essential for preserved human sperm function during the devitrification process. *Andrología* 2016; 48:111-113.
- Merino O, Aguagüiña E, Esponda P, Risopatrón J, Isachenko E, Isachenko V, Sánchez R. Protective effect of butylated hydroxytoluene on sperm function in human spermatozoa cryopreserved by vitrification technique. *Andrología* 2015; 47:186-193.
- Meseguer M, Garrido N, Martínez-Conejero JA, Simon C, Pellicer A, Remohi J. Role of cholesterol, calcium, and mitochondrial activity in the susceptibility for cryodamage after a cycle of freezing and thawing. *Fertil Steril* 2004; 82:514-515.
- Nawroth F, Isachenko V, Dessole S, Rahimi G, Farina M, Vargiu N & Mallmann PI. 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.
- Sánchez R, Risopatrón J, Schulz M, Villegas JV, Isachenko V, Isachenko E. Vitrified sperm banks: the new aseptic technique for human spermatozoa allows cryopreservation at -86 C. *Andrologia* 2012; 44:433-5.
- Sánchez R, Isachenko V, Petrunkina AM, Risopatrón J, Schulz M, Isachenko E. Live birth after intrauterine insemination with spermatozoa from an oligoasthenozoospermic patient vitrified without permeable cryoprotectants. *J Androl* 2012; 33:559-62.
- Sánchez R, Schulz M, Risopatrón J, Isachenko V, Isachenko E. Vitrificación de espermatozoides: una alternativa a la inyección intracitoplasmática de espermatozoides en paciente con oligoastenozoospermia severa. *Andrología* 2012; 11(1):36-39.
- Slabbert M, Du Plessis SS, Huyser C. Large volume cryoprotectant-free vitrification: an alternative to conventional cryopreservation for human spermatozoa. *Andrologia* 2014; xx:1-6.

TABLAS Y FIGURAS

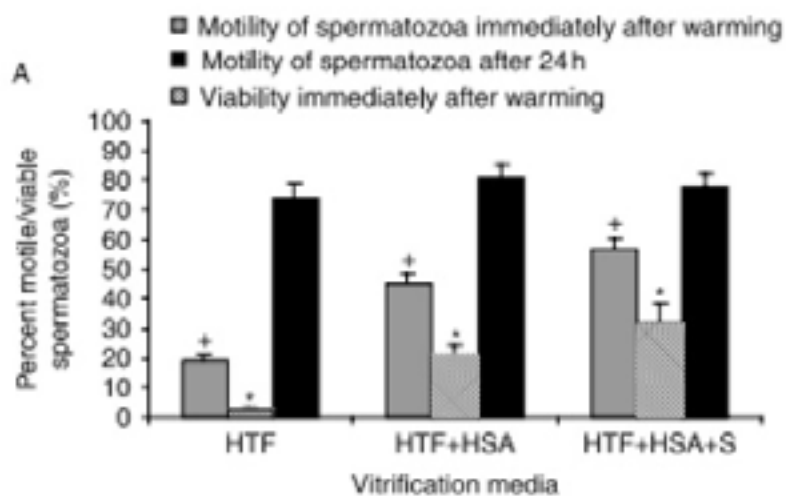


Figura 1. Influencia del HTF sólo o en combinación con HSA+sacarosa sobre la motilidad tras la vitrificación. Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$) (Isachenko et al., 2008).

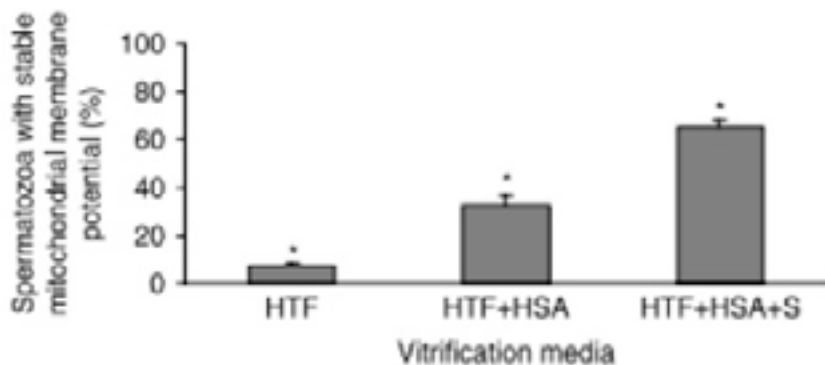


Figura 2. Influencia del HTF sólo o en combinación con HSA+sacarosa sobre el potencial de membrana mitocondrial tras la vitrificación. Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$) (Isachenko et al., 2008).

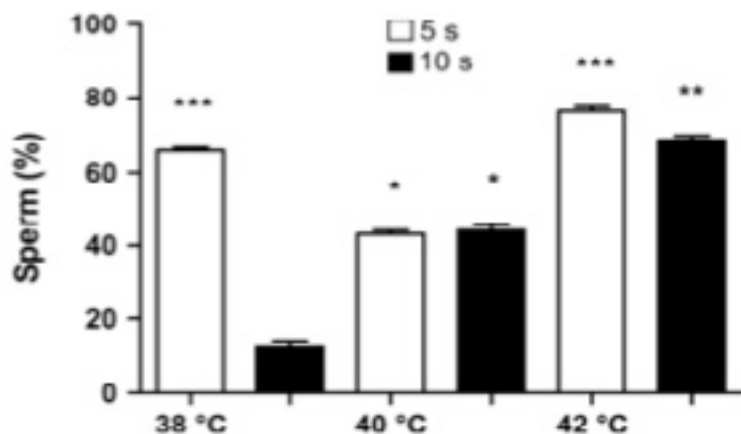


Figura 3. Porcentajes de la integridad de la membrana plasmática de espermatozoides humanos en el proceso de desvitrificación (warming) a diferentes temperaturas (38, 40 y 42°C) y a diferentes tiempos (5s y 10s). La diferente gradación mediante el número de asteriscos sobre las columnas muestra la menor o mayor significancia estadística (30°C, $p < 0.001$; 40°C $p > 0.05$; 42°C, $p < 0.05$) (Mansilla et al., 2015).

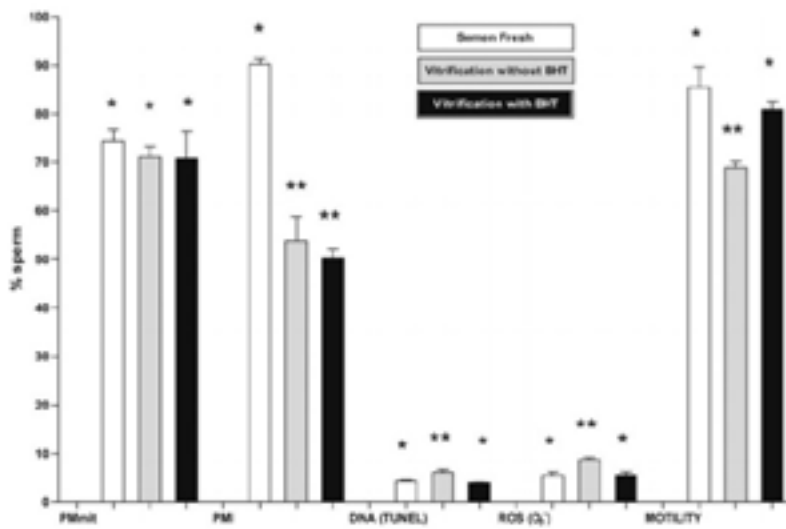


Figura 4. Porcentajes de: potencial de membrana mitocondrial (PMmit) obtenido mediante test JC-1, integridad de la membrana plasmática (PMI) obtenida mediante TUNEL, ROS mediante DHE/SYTOX y motilidad en espermatozoides en fresco, vitrificados sin BHT (control)) y con BHT. La diferente gradación mediante el número de asteriscos sobre las columnas muestra la menor o mayor significancia estadística ($p < 0.05$) (Merino et al., 2014).

Parameter	Vitrified human sperm stored at	
	-196 °C	-86 °C
Progressive (PR) motility (%)	77.0 ± 2.5	73.8 ± 2.4
Intact $\Delta\Psi_m$ (%)	74.6 ± 1.6	71.7 ± 1.7
DNA fragmentation (%)	2.9 ± 0.8	3.1 ± 0.6

Tabla I. Mantenimiento de la funcionalidad espermática tras la vitrificación: comparación entre almacenamiento a -86°C y -196°C (Sánchez et al., 2012).

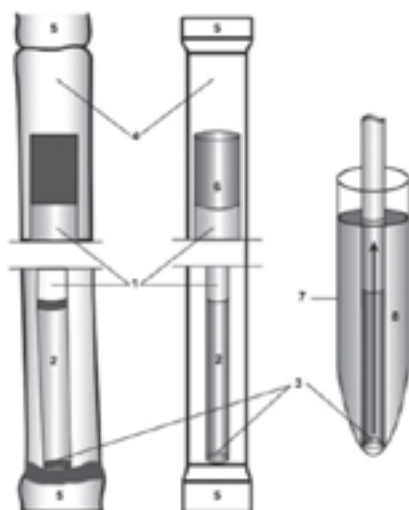


Figura 5. Método de vitrificación aséptica: pajuela interna de 0.25 mL llenada con 0.01 mL de medio (1), suspensión de espermatozoides (2), menisco de suspensión (3), pajuela de 0,5 mL (4), sellado con calor (5), marca sobre pajuela (6), tubo para descongelar (7), medio de descongelación (8) (Sánchez et al., 2012).

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

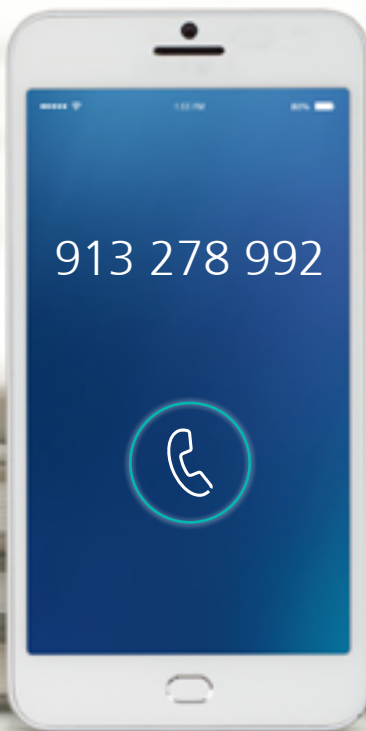


ESTÁS A UN PASO DE AHORRARTE HASTA 240 €* EN TUS SEGUROS.

Contrata ahora tus seguros de coche, moto, hogar, negocios (consulta) o negocios + hogar (consulta en casa).

Aprovecha esta oferta, solo para ti y tus familiares directos, si contratáis antes de final de año.

913 278 992
www.zurich.es/colegiosprofesionales



*Importe máximo por tomador: 240 €. Con independencia de la modalidad y del número total de nuevas pólizas citadas, con pago anual y según los requisitos fijados en las bases. Consulta bases de la promoción (ref. 201604) en <http://colectivos.zurich.es/colegiosprof/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.

EXISTEN DIFERENCIAS EN EL SEX-RATIO DE LOS NIÑOS NACIDOS TRAS UNA TRA? ESTUDIO RETROSPECTIVO EN EL CHGUV.

ARE THERE DIFFERENCES IN THE SEX-RATIO OF CHILDREN BORN AFTER AN ART? RETROSPECTIVE STUDY IN THE CHGUV.

Jose Gabriel Descals Ferrando ¹, Rubén Dasí Crespo ¹, Juan Manuel Moreno-Moya ¹, Carla Olmedo Illueca¹, Iris Martínez Rodero ¹, Irene Cuevas Sáiz¹.

¹Consortio Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, Avenida Tres Cruces, 2.

Resumen: En la población general, el sex-ratio en el nacimiento, que se define como el número de varones respecto a toda la población, se estima en torno al 0.52. Sin embargo, en los nacimientos de niños a partir de técnicas de reproducción asistida (TRA) se han registrado en la bibliografía tasas en el sex-ratio comprendidas entre 0.45–0.65 según la TRA empleada (ICSI o FIV, respectivamente), y estadio de desarrollo embrionario el día de transferencia (Estadio de células, o blastocisto), así como diferencias estadísticamente significativas respecto a la población general. En este trabajo se llevará a cabo una revisión bibliográfica de algunos de los trabajos publicados sobre el posible efecto de las TRA en el sex-ratio, exponiéndose las posibles causas de esta desviación respecto a la población general. Además, se comentarán los resultados obtenidos en el CHGUV sobre el sex-ratio de la descendencia obtenida tras TRA.

Palabras Clave: Sex-ratio primario, sex-ratio secundario, desviación, TRA, FIV, ICSI, transferencia embrionaria, estadio en células, blastocisto.

Abstract: In the general population, the sex ratio at birth, which is defined as the proportion of males in to the entire population, is estimated at around 0.52. However, in the births of children from assisted reproduction techniques (ART) have been reported sex ratios between 0.45 to 0.65 depending on the ART used (ICSI or IVF, respectively) on the stage of embryonic development at the day of embryo transfer (cleavage stage or blastocyst), and differences statistically significant compared to the general population. This paper will conduct a literature review of some papers analysing the possible effect of ART in the sex ratio, exposing the possible causes of this deviation. In addition, the results obtained in the CHGUV about the sex ratio of TRA offspring will be discussed.

KeyWords: Primary sex-ratio, secondary sex ratio, deviation, ART, IVF, ICSI, embryo transfer, cleavage-stage, blastocyst.

INTRODUCCIÓN

Las dos TRA *in vitro* más importantes son la fecundación *in vitro* convencional (FIVc) y la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). En primer lugar, el sex-ratio primario es el sex-ratio en el momento de la concepción, que se define como el número de ovocitos fecundados con el cromosoma Y que porta el espermatozoide respecto al total. Generalmente, el sex-ratio primario es difícil de averiguar ya que requiere de diagnóstico genético preimplantacional (DGP) (Zarutskie PW *et al.*, 1989) y debido a esto suele ser desconocido.

Por otro lado, el sex ratio en el nacimiento, también conocido como sex ratio secundario se define como la

proporción de varones al nacer respecto a todos los nacidos vivos, el cuál es mucho más fácil de averiguar y por ello es el más utilizado por las diferentes bases de datos en todo el mundo (James WH, 1989). Existe variación en el sex-ratio en la población general, situándose en torno el 0.52. Sin embargo, en niños nacidos mediante TRA varía de forma significativa en mayor magnitud que en cualquier otra población (Källén B *et al.*, 2005). Se han llevado a cabo estudios para investigar si el uso de una determinada TRA, o el estadio de desarrollo embrionario en el día de la transferencia (estadio en células o blastocisto) pueden alterar el sex-ratio en los nacidos.

Así pues, el objetivo de este estudio es llevar a cabo una revisión bibliográfica

y analizar el posible efecto de las diferentes técnicas de inseminación de los ovocitos y el estadio embrionario en el día de la transferencia sobre el sex-ratio.

SEX-RATIO SEGÚN LA TRA EMPLEADA

Se ha observado en diferentes estudios un aumento significativo en el sex-ratio en los nacidos obtenidos a partir de FIV y posterior transferencia de embriones, y un descenso significativo en el sex-ratio en los nacidos tras ICSI y transferencia de embriones (Thatcher *et al.*, 1989; Ghazzawiet *et al.*, 2000; Deanet *et al.*, 2010; Walid E *et al.*, 2014).

SEX-RATIO SEGÚN EL ESTADIO EMBRIONARIO EN EL DÍA DE TRANSFERENCIA EMBRIONARIA

La optimización de los medios de cultivo de embriones y las evidencias de la mayor tasa de implantación al transferir en estadio de blastocisto, junto con la tendencia a transferir un único embrión para evitar posibles complicaciones gestacionales asociadas a los embarazos múltiples, ha causado un aumento de transferencias en estadio de blastocisto en las clínicas de fertilidad de todo el mundo. En 1994, se observó que la transferencia de embriones de crecimiento más rápido resultó en un aumento del sex-ratio (Pergament *et al.*, 1994). Además, cabe destacar el efecto aditivo que se produce al combinarse estos dos factores, ya que se ha observado un mayor aumento en el sex-ratio tras la transferencia en estadio de blastocisto tras FIV, y un marcado descenso tras la transferencia en estadio de células embrionaria tras ICSI (0.487) (Dean *et al.*, 2010; Walid *et al.*, 2014).

MATERIAL Y METODOS

BASES DE DATOS

Para llevar a cabo este estudio retrospectivo, se consultaron diferentes

gemelares. 42 de los ciclos fueron realizados mediante FIV convencional y 150 mediante ICSI. La principal medida del estudio fue el sexo del nacido, y la técnica de inseminación de los ovocitos (FIV o ICSI).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizaron unos intervalos de confianza del 95% y se consideró significancia estadística en $P < 0.05$. El análisis estadístico se realizó mediante chi-cuadrado utilizando el paquete estadístico SPSS v 15.0.

RESULTADOS

ESTUDIO DE JUAN J TARÍN *ET AL.*, 2014

En este trabajo se llevó a cabo un meta-análisis de los artículos previamente publicados hasta el año 2013 que trataban el sex-ratio. Tal y como puede observarse en la Tabla I, se compararon los sex-ratios primarios a partir de ciclos donde se realizó un DGP y el secundario tras transferir embriones en estadio de células y blastocisto.

embriones obtenidos por ICSI fue de 0.482 cuando se transfirió en estadio de células y de 0.508 cuando se transfirió en estadio de blastocisto.

Estos resultados mostraron una desviación estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre los subgrupos. Además, hace evidente la necesidad de más estudios que comparen el sex-ratio primario con el secundario, siendo necesario para ello aplicar un DGP.

ESTUDIO DE DEAN JH *ET AL.*, 2010

En este estudio se llevó a cabo una revisión de todos los ciclos de reproducción asistida realizados en Australia y Nueva Zelanda entre los años 2002 y 2006 mediante la base de datos ANZARD. En el estudio se incluyó un tamaño muestral de 13.368 nacidos a partir de 13.165 mujeres donde se transfirió un único embrión (SET).

Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de FIV e ICSI ($P = 0.001$), donde un menor número de varones

Tipo de Inseminación	Embriones de 4-8 células ^a	Blastocistos – Día 5	Referencias
FIV	1.50 ^b (60/40)		(3)
	Total: 1.50 ^b (60/40)		
ICSI	0.88 (123/140)		(4)
		0.98 (225/229)	(30)
	1.18 (741/629)		(14)
	0.86 (96/112)		(7)
	Total: 1.09 (960/881)	Total: 0.98 (225/229)	

Tabla I. Sex-ratio (XY/XX) primario de los embriones según la TRA empleada y estadio de desarrollo embrionario, calculado mediante DGP. ^aEn el grupo de FIV, un total de 25 (17 varones y 8 mujeres) y 75 (43 varones y 32 mujeres) embriones fueron analizados en estadio de 4 y 8 células, respectivamente. En el grupo de ICSI, todos los embriones fueron analizados en estadio de 8 células. ^bEl sex-ratio de los embriones en estadio de 4-8 células sería de 1.29 (66/51) si consideráramos 17 embriones extra que mostraron un anormal número de señales de los cromosomas X e Y en las células biopsiadas. Adaptado del Meta-análisis por J. Tarín, García Pérez, Hermenegildo, y Antonio Cano (Juan J Tarín *et al.*, 2014).

bases de datos en la bibliografía, además de la base de datos de la Unidad de Medicina Reproductiva del Hospital General Universitario de Valencia.

En el estudio del CHGUV, se analizó retrospectivamente el sexo de los niños nacidos de 165 ciclos de fecundación *in vitro* entre Mayo de 2005 y Diciembre de 2014. Se registraron un total de 192 nacimientos de sexo conocido, 27 de ellos provenientes de gestaciones

En la Tabla I se observan los resultados obtenidos, donde el sex-ratio primario de los embriones obtenidos mediante FIV se sitúa en torno el 0.6, mientras que el de los obtenidos por ICSI se sitúa en torno el 0.53. Por otro lado, en la Tabla II puede observarse el sex-ratio secundario de los embriones obtenidos por FIV, que fue de 0.515 tras transferencia en estadio de células y de 0.555 tras transferencia en estadio de blastocisto, mientras que para los

nacía tras ICSI (0.50), mientras que un mayor número nacían tras FIV (0.53) (Tabla III). Por otro lado, se observó un aumento en el sex-ratio secundario tras realizarse la transferencia en estadio de blastocisto (0.541) y un descenso al realizarse la transferencia en estadio de células (0.499), ($P < 0.001$). Además, se estratificaron los datos para cada subgrupo, y se calculó el sex-ratio para cada uno, tal y como se puede observar en la Figura 1.

Tipo de Inseminación	Día de Transferencia Embrionaria	Sex-ratio	Referencias ^a
FIV	≤ Día 3 ^b	0.98 (1929/1968)	(23)
		1.08 (2084/1932)	(24)
	Total: ≤ Día 3 ^b	1.03 (4013/3900)	
	> Día 3 ^c	1.22 (1030/846)	(23)
		1.28 (1088/852)	(24)
ICSI	Total: > Día 3 ^c	1.25 (2118/1698)	
	≤ Día 3 ^b	0.94 (3047/3236)	(23)
		0.95 (2414/2542)	(24)
	Total: ≤ Día 3 ^b	0.95 (5461/5778)	
	> Día 3 ^c	0.98 (1542/1566)	(23)
	1.10 (1289/1167)	(24)	
	Total: > Día 3 ^c	1.04 (2831/2733)	

Tabla II. Sex-ratio (XY/XX) secundario de los nacidos según la TRA empleada y el estadio de desarrollo embrionario en el momento de la transferencia. ^aA partir de bases de datos de reproducción asistida de EEUU (23) y Nueva Zelanda (24). ^bTransferencia en estadio en células. ^cTransferencia en estadio de blastocisto. Adaptado del Meta-análisis por J. Tarín, García Pérez, Hermenegildo, y Antonio Cano (Juan J Tarín et al., 2014).

Características	Número y %	Edad media (años) en el momento del tratamiento (media ± DT)		Sex-ratio (%)*	OR (95% IC)**
		Mujer	Pareja		
Nacidos por SET	13.368	33.2 ± 4.3	36.3 ± 6.1	51.3	
2002	1.165	33.5 ± 4.4	36.8 ± 6.2	51.4	
2003	1.561	33.1 ± 4.4	36.4 ± 6.0	51.2	
2004	2448	33.0 ± 4.3	36.2 ± 6.2	51.9	
2005	3446	33.2 ± 4.1	36.3 ± 6.1	50.5	
2006	4748	33.2 ± 4.3	36.3 ± 6.1	51.6	
Tipo de Inseminación					
FIV	44.6%	33.4 ± 4.2	35.6 ± 5.4	53.0	1
ICSI	55.4%	33.0 ± 4.3	36.9 ± 6.6	50.0	0.89 (0.83, 0.95)
Estadio Embrionario en la Transferencia					
Estadio en células SET	67.1%	33.2 ± 4.4	36.4 ± 6.2	49.9	1
Estadio en blastocisto SET	32.9%	33.2 ± 4.1	36.2 ± 6.0	54.1	1.18 (1.18, 1.27)
Tipo de Embrión					
Fresco SET	69.1%	32.8 ± 4.2	36.0 ± 6.2	51.9	1
Congelado SET	30.9%	34.0 ± 4.4	37.2 ± 6.3	49.9	0.92 (0.86, 0.99)
Causa de la Infertilidad					
Masculina	40.6%	32.8 ± 4.2	36.9 ± 6.7	50.6	1 (0.93, 1.13)
Femenina	16.3%	33.3 ± 4.1	35.2 ± 5.2	51.2	1.02 (0.89, 1.18)
Mixta	7.1%	33.3 ± 4.4	36.2 ± 5.8	51.1	1.02 (0.97, 1.15)
Desconocida	29.3%	33.6 ± 4.4	36.2 ± 5.7	52.0	1.06 (0.97, 1.15)
Otra ***	6.6%	33.6 ± 4.8	36.4 ± 6.4	53.0	1.10 (0.95, 1.27)

Tabla III. Sex-ratio en el nacimiento según la TRA empleada o estadio de desarrollo el día de la transferencia. Transferencia de un único embrión (SET). Adaptado de JH Dean, MG Chapman, EA Sullivan 2010. * Sex-ratio en el nacimiento o secundario (SSR): Proporción de varones respecto del total de nacimientos. ** Regresión logística para predecir los odds ratio (OR) y 95% de intervalo de confianza (IC) para un nacimiento de un varón por factor único. *** Otras incluye causa desconocida.

El mayor sex-ratio fue el obtenido para los embriones del subgrupo IVF-BT (blastocisto) (0.561), y el menor sex-ratio fue el obtenido para los embriones del subgrupo ICSI-estadio de células (0.487), con una diferencia entre los grupos significativa ($P < 0.001$) respecto de la población general en el

sex-ratio (0.515). La potencia de este estudio se apoya en su gran tamaño muestral. Sin embargo, una de las limitaciones del estudio es, al tratarse de un estudio multicéntrico, la gran variabilidad entre clínicas (medios de cultivo, protocolos de trabajo, criterio de selección...) que deberían tenerse en

cuenta en estudios futuros con el fin de normalizar la población.

ESTUDIO DE WALID E. ET AL., 2014

En este estudio retrospectivo se llevó a cabo una revisión de 85.511 ciclos de TRA realizados en Reino Unido

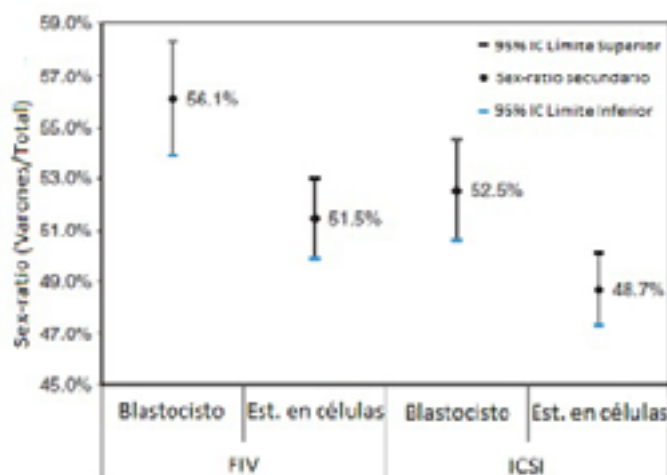


Figura 1. Sex-ratio en el nacimiento de los niños nacidos tras transferencia de un único embrión según la TRA empleada y estadio de desarrollo embrionario el día de la transferencia. Resultados de Australia y Nueva Zelanda, 2002-2006. Adaptado de JH Dean, MG Chapman, EA Sullivan 2010.

entre los años 2000 y 2010. Se incluyó en el estudio un tamaño muestral de 106.066 nacidos de sexo conocido a partir de 76.994 pacientes. El sex-ratio obtenido en el nacimiento tras aplicarse respectivamente una IA, FIV o ICSI, puede observarse en la Figura 2. La diferencia entre el sex-ratio obtenido tras aplicarse una IA o una FIV, no es significativa. Sin embargo, el sex-ratio obtenido tras aplicarse una ICSI (0.493) era menor que tras aplicarse una FIV (0.521) de forma significativa ($P < 0.05$), respecto de la población general en Reino Unido (0.513).

tras todas las TRA combinadas fue significativamente menor que en la población general (0.507) ($P = 0.0005$).

ESTUDIO EN EL CHGUV

De los 42 nacimientos de FIV, 22 fueron varones y 20 fueron mujeres. Por otro lado, de los 150 nacidos tras ICSI, 72 fueron varones y 78 fueron mujeres. El sex-ratio de los nacidos mediante FIV fue de 0,524 mientras que el de los nacidos mediante ICSI fue de 0,480, tal y como puede observarse en la Figura 3. Sin embargo no se apreció diferencia

individuos (Dean *et al.*, 2010).

DISCUSIÓN

Las posibles causas de esta desviación en el sex-ratio de los niños nacidos tras una TRA permanecen inciertas. En base a los resultados obtenidos, se han desarrollado diferentes teorías para tratar de explicar este hecho.

TECNICA DE CAPACITADO SEMINAL EMPLEADA

Los dos procedimientos más utilizados para la capacitación seminal son los gradientes de densidad y el swim-up. En una revisión bibliográfica (Boomsma CM *et al.*, 2004) se concluyó que no existía diferencia significativa en las tasas de implantación y de embarazo según la técnica de capacitado de semen empleada. Sin embargo, los gradientes de densidad pueden dar lugar a un enriquecimiento de espermatozoides portadores del cromosoma Y (Ericsson RJ *et al.*, 1973), lo que podría contribuir a un aumento de la proporción de varones en las IAs y FIV, ya que es la técnica de capacitado empleada en estos estudios. No obstante, existen estudios (Walid E *et al.*, 2014) que afirman que ni el swim-up ni los gradientes de densidad enriquecen selectivamente

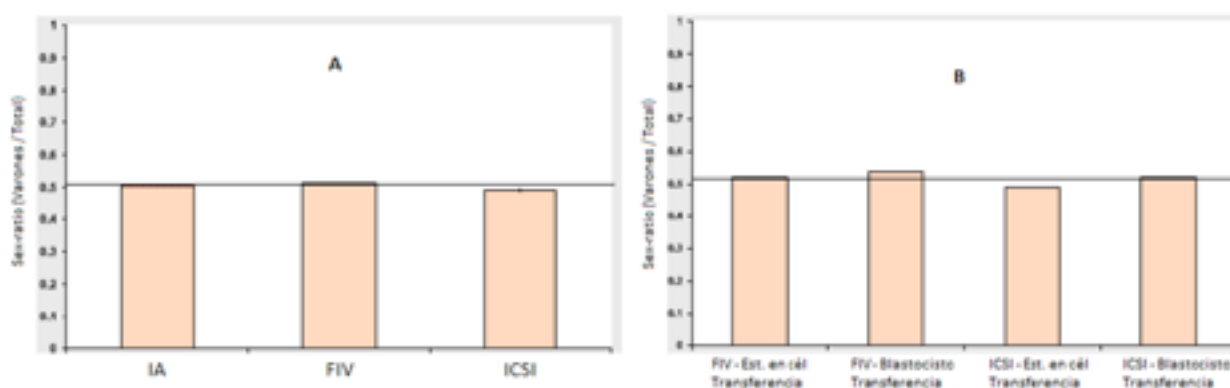


Figura 2. A: Sex-ratio en el nacimiento tras IA, FIV, o ICSI. B: Sex-ratio en el nacimiento tras FIV o ICSI y tras transferencia en estadio de células o blastocisto. La línea horizontal continua muestra el sex-ratio medio tras las 3 TRA combinadas (0.507). Adaptado de Walid E. Maalouf, Mina N. Mincheva, Bruce K. Campbell, Ian W. Hardy (Walid E *et al.*, 2014).

En la Figura 2 se observa que el sex-ratio fue significativamente mayor cuando la transferencia embrionaria se realizó en estadio de blastocisto tanto para FIV (0.539) como para ICSI (0.519), que cuando se realizó en estadio de células (0.521 y 0.489, respectivamente). El sex-ratio secundario de los nacidos

estadísticamente significativa ($P > 0,05$) entre ambos grupos (FIV o ICSI), aunque es posible observar una tendencia. En relación a estos resultados, cabe mencionar que para poder detectar con significancia estadística de 0.05 una desviación del 1,5%, es necesario un tamaño poblacional de en torno 12.000

espermatozoides portadores del cromosoma X o Y de forma significativa, o incluso un enriquecimiento de portadores del cromosoma X, con lo que esta hipótesis podría ser descartada.

CAPACIDAD FECUNDADORA ESPERMÁTICA

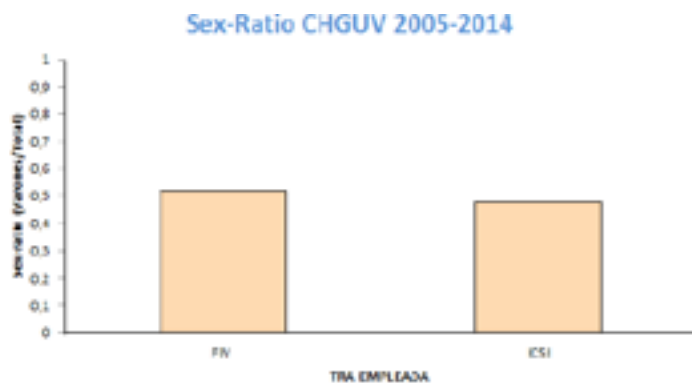


Figura 3. Sex-ratio en el nacimiento o secundario obtenido en el CHGUV según la TRA empleada (FIV o ICSI) entre los años 2005-2014.

Por otro lado, según Tarín *et al.*, 2014, el aumento en el sex-ratio tras aplicarse una IA o FIV puede deberse a que los ovocitos puedan ser más susceptibles a la fecundación por espermatozoides portadores del cromosoma Y, y/o que los espermatozoides Y posean mayor capacidad fecundadora.

Según esta teoría, durante la foliculogénesis cambia la composición de la ZP (Zona Pelúcida) de los ovocitos, de forma que los altos niveles de testosterona en el líquido folicular varían la composición de los hidratos de carbono de la ZP. Este cambio podría favorecer la fecundación por parte de los espermatozoides Y (Grant VJ *et al.*, 2010). Además, existen genes disruptores que se expresan tras la meiosis en espermátidas que son capaces de alterar el sex-ratio afectando a la maduración y capacidad fecundadora de los espermatozoides, favoreciendo en este caso a los espermatozoides portadores del cromosoma Y (Ellis PJ *et al.*, 2011).

MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA

Por otro lado, en la ICSI el espermatozoide es seleccionado por el embriólogo, atendiendo a características morfológicas y de movilidad. Un menor sex-ratio tras ICSI se ha relacionado a la infertilidad por el factor masculino, ya que la ICSI es la técnica de elección en los casos de pobre calidad seminal (Setti AS *et al.*, 2012), y donde los espermatozoides portadores del cromosoma Y presentan peor calidad morfológica, tendiendo a ser menos seleccionados bajo esta técnica (Walid E *et al.*, 2014). Estos resultados coinciden con lo aportados por Tarín *et al.*, (Juan J

Tarín *et al.*, 2014), donde se observó un descenso muy marcado en el sex-ratio al aplicarse una IMSI (micro-inyección de espermatozoides morfológicamente seleccionados por magnificación) siendo éste de 0.35, mientras que cuando se realizó una ICSI este descenso fue menor. Además, se sugirió la existencia de mecanismos iatrogénicos por los cuales el sex-ratio tras ICSI disminuye, ya que se observó este descenso incluso en los casos donde se aplicó ICSI a pesar de no existir factor masculino (Luke B *et al.*, 2007).

POTENCIAL EVOLUTIVO EMBRIONARIO *IN VITRO* DEPENDIENTE DEL SEXO

La hipótesis consiste en que los embriones varones poseen un potencial evolutivo y tasas de crecimiento superiores respecto a los femeninos a partir del tercer día de cultivo *in vitro*, de forma que mostrarán más células en el momento de la transferencia embrionaria, tendiendo a ser seleccionados para transferir con mayor frecuencia embriones varones que femeninos (Milki AA *et al.*, 2003). Según Bonduelle *et al.*, 2002, los embriones XY presentan un mayor número de células en el estadio de blastocisto que los XX, lo que les podría conferir una ventaja evolutiva. Este hecho se debe a la diferente respuesta de cada sexo a los medios de cultivo *in vitro*, debido al segundo cromosoma X presente en los femeninos pero no en los varones, manteniendo estos últimos una mayor actividad evolutiva en la etapa de mórula (Gutierrez-Adan A *et al.*, 2000).

Los genes responsables de la captación de glucosa y del metabolismo (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, G6PD) y de

antioxidantes (hipoxantina fosforribosil transferasa HPRT) se encuentran en el cromosoma X, y por lo tanto los embriones femeninos presentarán una mayor captación de glucosa y detoxificación de radicales libres de oxígeno (Walid E *et al.*, 2014). Estos radicales libres presentan un efecto estimulante de crecimiento embrionario (Peipoo J *et al.*, 1995) y no sólo están involucrados en los mecanismos de daño celular, lo cual podría beneficiar el desarrollo de los embriones varones.

INACTIVACIÓN DEL SEGUNDO CROMOSOMA X EN EMBRIONES XX

Esta desviación podría deberse a una mayor mortalidad de los embriones XX en etapas tempranas post-implantación, debido en parte a una anormal inactivación del segundo cromosoma X (mecanismo de compensación de dosis) (Tarín *et al.*, 2014).

Para resolver esta cuestión, se diseñó un modelo de implantación embrionaria *in vitro*, y se observó que en los embriones femeninos se producía una inactivación del cromosoma X en la mayor parte de sus células tras la implantación (Tarín *et al.*, 2014). No obstante, esta inactivación post-implantación del cromosoma X podría estar alterada por factores epigenéticos, como la metilación de DNA, o deacetilación de histonas.

Este aumento o disminución en la expresión de genes relativos al cromosoma X puede afectar a la implantación o al desarrollo embrionario post-implantación. Además, se ha observado una expresión de genes relativos al segundo cromosoma X caótica, produciéndose anomalías severas en tejidos embrionarios y extra-embrionarios y una aparente muerte embrionaria precoz (Schulz EG *et al.*, 2013). Al parecer, el cultivo *in vitro* largo de embriones femeninos en condiciones sub-óptimas (oxígeno ambiental, variaciones de temperatura) puede ser uno de estos factores (Juan J Tarín *et al.*, 2014).

Esta hipótesis es cuestionada por los siguientes motivos: no se observa una diferencia significativa en la tasa de abortos tras transferencia en Día 3 (8%) y

transferencia en Día 5 (9,2%) (Glujovsky *et al.*, 2012) como cabría esperar, y se observa una mayor tasa de nacimientos tras transferencia el Día 5 (38,9%) y Día 3 (31,2%). Según esta teoría, se debería esperar un mayor número de abortos y menor tasa de nacimientos tras transferencia en Día 5. Además, la mortalidad de embriones femeninos por una deficiente inactivación del cromosoma X ocurriría en etapas muy tempranas del embarazo, y estas pérdidas no se contabilizan en las tasas de aborto. En este contexto, cabe destacar que la transferencia en Día 5 se asocia a una mayor tasa de embarazo bioquímico (14.1%) que la transferencia en Día 3 (8.2%) (Poikkeus *P et al.*, 2002).

Como conclusión, existe un cambio en el sex-ratio secundario significativo en los nacidos a partir de TRA. Diversos estudios concluyen que el sex-ratio secundario aumenta significativamente al transferir blastocistos, o embriones procedentes de una FIV, y disminuye al transferir embriones en estadio de células, o embriones procedentes de una ICSI. Estos dos factores tienen un efecto sinérgico.

Debido al progresivo aumento en el número de niños nacidos a partir de TRA en todo el mundo, son necesarias investigaciones futuras que traten los factores biológicos y ambientales que podrían alterar el sex-ratio tras una determinada TRA, y su posible efecto en la población general. Las clínicas de fertilidad de todo el mundo y los pacientes deberían ser conscientes de este hecho al aplicar una determinada TRA.

En el estudio en el Hospital General Universitario de Valencia, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas, probablemente debido al pequeño tamaño muestral, se apreció una desviación en el sex-ratio según la técnica de inseminación empleada, a favor cuando se aplica una FIV y en contra al aplicarse una ICSI. Se realizarán futuros estudios sobre este hecho.

BIBLIOGRAFÍA

- Boomsma CM, Heineman MJ, Cohlen BJ, Farquhar C. Semen
- Dean JH, Chapman MG, Sullivan EA. The effect on human sex-ratio at birth by assisted reproductive technology (ART) procedures – an assessment of babies born following single embryo transfers, Australia and New Zealand, 2002-2006. *Epidemiology* 2010.
- Ellis PJ, Yu Y, Zhang S: Transcriptional dynamics of the sex chromosomes and the search for offspring sex-specific antigens in sperm. *Reproduction* 2011, 142:609–619.
- Ghazzawi IM, Sarraf M, Alhasani S. Children born after ICSI: are we altering sex-ratio? *Int J GynaecolObstet* 2000;70(Suppl 2):866.
- Glujovsky D, Blake D, Farquhar C, Bardach A: Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev* 2012, 7, CD002118.
- Grant VJ, Chamley LW: Can mammalian mothers influence the sex of their offspring peri-conceptually? *Reproduction* 2010, 140:425–433.
- Gutierrez-Adan A, Oter M, Martinez-Madrid B, Pintado B, De La Fuente J. Differential expression of two genes located on the X chromosome between male and female *in vitro*-produced bovine embryos at the blastocyst stage. *MolReprod Dev* 2000;55:146–51.
- James WH. The human sex-ratio. Part 1: A review of the literature. *Human Biology* 1989;59:721–52.
- Juan J Tarín, Miguel A García Pérez, Carlos Hermenegildo, Antonio Cano. Changes in sex-ratio from fertilization to birth in assisted-reproductive-treatment cycles. *Reproductive Biology and endocrinology*.2014, 12:56.
- Källén B, Finnstrom O, Nygren K-G, Olausson PO. *In vitro* fertilization (IVF) in Sweden: infant outcome after different IVF fertilization methods. *FertilSteril* 2005;84:611-7.
- Luke B, Brown MB, Grainger DA, Stern JE, Baker VL, Ginsburg E. The sex-ratio of singleton offspring in assisted-conception pregnancies. *FertilSteril* 2007, 88(Suppl 1):259.
- Maryse Bonduelle, Inge Liebaers, Veerle Deketelaere, Marie-Paule Derde, m. Camus, Paul Devroey and André Van Steirteghem. Neonatal data on a cohort of 2889 infants born after ICSI (1991-1999) and of 2995 infants born after IVF (1983-1999). *Human Reproduction* Vol.17, No.3 671-694, 2002.
- Milki AA, Jun SH, Hinckley MD, Westphal LW, Giudice LC, Behr B. Comparison of the sex-ratio with blastocyst transfer and cleavage stage transfer. *J Assist Reprod Genet* 2003;20:323–6.
- Pergament E, Fiddler M, Cho N, Johnson D, Hofmgren WJ. Sexual differentiation and preimplantation cell growth. *Human Reproduction* 1994,9: 1730-2.
- Poikkeus P, Hiilesmaa V, Tiitinen A: Serum HCG 12 days after embryo transfer in predicting pregnancy outcome. *Hum Reprod* 2002, 17:1901–1905.
- Schulz EG, Heard E: Role and control of X chromosome dosage in mammalian development. *CurrOpin Genet Dev* 2013, 23:109–115.
- Thatcher SS, Restrepo U, Lavy G, DeCherney AH. *In vitro* fertilization and sex-ratio. *Lancet* 1989;333:1025-6.
- Walid E. Maalouf, Mina N. Mincheva. Bruce K. Campbell, Ian C. Effects of assisted reproductive technologies on human sex-ratio at birth. *FertilSteril* 2014 282-5.
- Zarutskie PW, Muller CH, Magone M, Soules MR. The clinical relevance of sex selection techniques. *FertilSteril* 1989;52:8

MADURACIÓN IN VITRO

Laura Escrich, Noelia Grau y M^a Jose Escribá.
Laboratorio FIV, IVI Valencia

INTRODUCCIÓN

La maduración in vitro (MIV) es una tecnología aplicada en técnicas de reproducción humana asistida, siendo un método por el cual los ovocitos inmaduros procedentes de folículos antrales, se extraen y se maduran en el laboratorio (Figura 1).

Desde la primera experimentación en MIV que fue inicialmente descrita por Pincus y Enzmann (Pincus y Enzmann 1935) en ovocitos de conejo y hasta la actualidad, los protocolos y mejoras de esta metodología han ido avanzando y adaptándose a la aplicación clínica.

La primera MIV de ovocitos humanos y, la primera fecundación de un ovocito madurado in vitro, fue publicada por Edwards (Edwards 1965). Estos hallazgos fueron aplicados inicialmente en un contexto clínico por el equipo del Dr. Veeck, quienes rescataron ovocitos inmaduros recuperados de folículos sometidos a estimulación ovárica con gonadotrofinas (Veeck et al., 1983). Con esta estrategia se demostró que los ovocitos inmaduros no solo eran capaces de culminar la maduración in vitro de forma espontánea, sino también que eran susceptibles de ser fecundados y capaces de desarrollarse in vitro correctamente hasta el estadio de blastocisto.

Los avances en la metodología de MIV ovocitaria permitieron la práctica estricta de la MIV por la que, los ovocitos inmaduros, procedentes de pequeños folículos antrales, en asociación a ciclos de fecundación in vitro no estimulados (o con una mínima estimulación ovárica controlada), son inducidos a madurar mediante complejos sistemas de cultivo in vitro. El equipo del Dr. Trounson consolidó el uso clínico de la MIV tras publicar el primer embarazo en pacientes con síndrome de ovario

poliquístico, de las que se recuperaron ovocitos inmaduros de ovarios no estimulados (Trounson et al., 1994).

INDICACIONES PARA MIV

La mayoría de trabajos referentes a maduración ovocitaria in vitro comprende ovocitos inmaduros, recuperados de folículos de pequeño tamaño, de los que se espera obtener precisamente eso, ovocitos inmaduros y crecidos en ovarios no estimulados exógenamente. Estos procedimientos de MIV de ciclos no estimulados o con estimulación suave, pretenden básicamente: i) prevenir a las pacientes de desarrollar una hiperestimulación ovárica; ii) reducir los costes asociados a la estimulación ovárica y iii) reducir la complejidad del tratamiento, eliminando la administración de gonadotrofinas.

Históricamente, la MIV sin estimulación ovárica ha beneficiado a aquellas pacientes que presentaban ovario poliquístico (PCO) o síndrome de ovario poliquístico (Chian et al., 2000; Le Du et al., 2005; Lin et al., 2003; Mikkelsen y Lindenberg 2001), debido al gran número de folículos antrales disponibles por ovario al inicio de la fase proliferativa; lo que, sumado a un protocolo de estimulación ovárica con gonadotrofinas culminaría, casi inevitablemente en un síndrome de hiperestimulación ovárica.

La MIV en ciclo no estimulado también se sugiere como tecnología reproductiva para aquellas pacientes con ovarios normales y ciclos menstruales regulares (Yoon et al., 2001). En este colectivo de pacientes, el objetivo principal es la minimización de los costes derivados de la administración de gonadotrofinas así como la dificultad de los protocolos de fecundación in vitro asociados a la estimulación ovárica controlada.

Asimismo, la MIV se propone como método de elección para pacientes con cáncer, particularmente aquéllas que requieren de una rápida preservación de la fertilidad o presentan un tipo de cáncer sensible a los niveles estrogénicos (Oktay et al., 2010; Fadini et al., 2012).

Sin embargo, la tecnología de MIV también es aplicada en asociación a ciclos de estimulación ovárica controlada. En este caso, no sería una MIV en sentido estricto, ya que la intención del procedimiento de MIV es rescatar ovocitos inmaduros recuperados de folículos de buen tamaño y, los cuales debería haberse obtenido en principio, ovocitos maduros. Tales ovocitos inmaduros, en el caso de ser rescatado, pueden incrementar potencialmente el número de ovocitos del ciclo y, por consiguiente, el número de pre-embiones disponibles (Escrich et al., 2012; Lee et al., 2016).

De hecho esta metodología de rescate ovocitario adquiere un principal interés en aquellas pacientes con baja respuesta o en determinadas circunstancias, cuando el número de ovocitos maduros es más reducido, ya que el éxito del ciclo reproductivo en curso queda comprometido; en estos casos, la MIV es la única alternativa para lograr una gestación (Liu et al., 2003; Lee et al., 2016).

ESTUDIOS MIV

La literatura referente a la optimización de la MIV clínica es extensa y de difícil manejo, debido al empleo de una misma terminología, la maduración in vitro, para describir diversas prácticas y técnicas. Así, la MIV de ovocitos inmaduros ha sido descrita en ciclos estimulados y no estimulados (Cha et al., 2000; Mikkelsen y Lindenberg 2001; Reichman et al., 2010; Escrich et al.,

2012) asociados a la inducción o no de la ovulación (Le Du et al., 2005; Yoon et al., 2001); en presencia de las células del cúmulus o sin ellas (Kim et al., 2000; Liu et al., 2003); con diferentes periodos de maduración (Nogueira et al., 2000; Reichma et al., 2010); empleando distintos medios de cultivo y suplementos (De Araujo et al., 2009; Guler et al., 2000), etc.

Estas situaciones tan diversas y/o las combinaciones de las mismas, dificultan la comparación entre estudios, especialmente cuando las técnicas de laboratorio, medios de cultivo y tipo de estimulación no están explícitamente definidos.

Las tasas de éxito, el tipo de cultivo, las indicaciones y, en general, la manera de abordar la técnica de MIV, dependen del origen de los ovocitos que vayan a ser sometidos a la técnica en cuestión. De manera general, se podría dividir la MIV en dos amplios grupos, MIV de ovocitos procedentes de ciclos no estimulados y la MIV de ovocitos procedentes de ciclos estimulados.

MIV de ovocitos procedentes de ciclos no estimulados

Referente al protocolo clínico para la aplicación de la MIV, éste no ha cambiado substancialmente desde que se aplicara inicialmente. En síntesis, se han empleado estas variantes:

i) MIV sin gonadotrofinas: es el protocolo más original y riguroso, por el que el crecimiento folicular discurre en ausencia de gonadotrofinas exógenas y, en el que la recuperación ovocitaria se practica cuando el folículo de mayor diámetro mide entre 10 y 12 mm; un estadio en el cual aún no se ha establecido la dominancia folicular (Cha et al., 2000).

ii) MIV con estimulación ovárica suave: es un protocolo alternativo por el que el crecimiento folicular es sustentado con dosis bajas de gonadotrofinas; en general se administran 150 UI durante 3 días empezando en el día 3 del ciclo menstrual. Es concebible que la administración de pequeñas dosis de esta hormona pueda mejorar la salud

folicular e incrementar el número y calidad de los ovocitos recuperados; sin embargo, los resultados no son concluyentes (Lin et al., 2003; Mikkelsen y Lindenberg 2001).

iii) MIV con hCG-primed, asociado o no a estimulación ovárica suave: este protocolo se propone para facilitar la reanudación de la meiosis in vivo antes de alcanzar la maduración completa in vitro. Normalmente se administra 10.000 UI de hCG cuando el folículo de mayor diámetro alcanza 10-12 mm; realizando la punción 36-38 horas después. Muchos estudios han mostrado la mayor eficacia de los procedimientos de MIV tras la administración exógena de hCG (Chian et al., 2000; Son et al., 2008b), lo que ha permitido incrementar significativamente la tasa de embarazo tras MIV (Chian et al., 2000).

Por lo que respecta a las condiciones de maduración, concretamente referidas al medio de cultivo y sus suplementos, en líneas generales, cabría indicar que deben simular las condiciones fisiológicas intrafoliculares en las que se encuentran los ovocitos objeto de maduración. Llama la atención la existencia de relativamente pocos estudios sobre los medios de cultivo (De Araujo et al., 2009; Moschini et al., 2011), pese a la gran relevancia que esta variable puede llegar a tener sobre la MIV. Se han introducido medios comerciales específicos de MIV, pero no hay evidencias de que su formulación sea idónea para dicho fin. La mayor parte de los modelos de maduración ovocitaria in vitro incluyen la adición de hormonas, destacando la inclusión de FSH, LH, progesterona y estradiol (Trounson et al., 1994). Por su parte, la adición de factores de crecimiento a los medios de maduración ha mostrado ser beneficiosa por incrementar tanto la tasa de maduración nuclear como el potencial de formación de estructuras pronucleares tras la activación ovocitaria (Guler et al., 2000).

Por lo que respecta a los resultados publicados, las tasas de maduración alcanzadas por ovocitos madurados in vitro tras 48 horas de cultivo fueron superiores al 60% (60-85%), madurando la mayoría de los ovocitos

en las primeras 24 horas de cultivo (Tabla 1). En estos ovocitos se observó además que las tasas de fecundación tras microinyección intracitoplasmática de espermatozoides, así como la capacidad de división de los ovocitos madurados in vitro fueron comparables a las observadas en aquéllos madurados in vivo (Chian et al., 2000; Le Du et al., 2005; Lin et al., 2003). En el trabajo de Son (Tabla 1), se muestran dichas tasas, en función del tiempo requerido para alcanzar la madurez nuclear, mostrando que los ovocitos madurados a las 48 horas presentaban significativamente una menor tasa de fecundación, división y desarrollo pre-embrionario in vitro que sus homólogos madurados in vitro durante las primeras 24 horas y aquéllos madurados in vivo (Son et al., 2008a).

En cuanto a los resultados clínicos derivados a partir de ovocitos madurados in vitro, procedentes de pacientes PCO, se han reportado tasas de gestación variables que oscilan entre el 20-38.5% y tasas de implantación entre el 9% y el 42.8%; tasas que resultan más elevadas que aquellas reportadas para ovocitos madurados in vitro pero procedentes de paciente con ovarios normales (Tabla 1).

Por su parte, el análisis cromosómico de los pre-embriones generados a partir de ovocitos madurados in vitro y obtenidos de ciclos no estimulados (Gras et al., 1992; Racowsky et al., 1992), indica tasas de aneuploidías o alteraciones cromosómicas estimadas en aproximadamente el 20%, similares a las reportadas para ovocitos madurados in vivo tras estimulación gonadotrófica y asociados a ciclos de FIV convencionales (Gras et al., 1992; Munne et al., 1993). Aunque estas tasas pudieran parecer elevadas, Lin et al. reportaron 21 nacidos vivos con cariotipo normal y sin malformaciones congénitas cuyo crecimiento y seguimiento fue normal (Lin et al., 2003); habiéndose obtenido a partir de ovocitos madurados in vitro y recuperados de ciclos FSH y hCG-primed. De forma similar, Cha et al. y Child et al. reportaron recién nacidos vivos normales (Cha et al., 2000; Child et al., 2002).

MIV de ovocitos procedentes de ciclos estimulados

En general, los antecedentes bibliográficos encontrados y referentes a la maduración in vitro (MIV) espontánea de ovocitos inmaduros, recuperados de ciclos estimulados, son escasos (Chian y Tan 2002; Kim et al., 2000; Nogueira et al., 2000; Farsi et al., 2011; Reichman et al., 2010; Escrich et al., 2011; Escrich et al., 2012).

Por lo que respecta a la estimulación, el uso de gonadotrofinas es práctica rutinaria vinculada a los ciclos de FIV. Existen muchos protocolos de estimulación ovárica, siendo los más generales:

- i) Uso de agonistas de la GnRH desde la mitad de la fase lútea del ciclo menstrual previo, en protocolo largo, para la supresión hipofisaria, seguido de la utilización de dosis convencionales de FSH o hMG.
- ii) Uso de agonistas de la GnRH en un protocolo "flare", seguido de la utilización de dosis convencionales de FSH o hMG.
- iii) Uso de antagonistas de la GnRH en un protocolo de estimulación con dosis convencionales de FSH o hMG, iniciadas desde el inicio del ciclo menstrual.

En todos estos protocolos se realiza una monitorización de los folículos así como mediciones de los niveles de estradiol en sangre. De modo general, cuando 2 folículos alcanzan un tamaño de unos 18 mm de diámetro y la concentración de estradiol es mayor de 500 pg/mL, se administra 10.000 UI de hCG y, transcurridas 34-36 horas se realiza la punción ovárica para la captación ovocitaria.

Por lo que respecta al medio de maduración, los diversos estudios muestran que existe una gran variabilidad, desde un medio comercial estándar de cultivo pre-embionario (Nogueira et al., 2000; Farsi et al., 2011; Reichman et al. 2010; Escrich et al., 2012), hasta medios de cultivo con una formulación propia de la maduración ovocitaria (Chian y Tan 2002; Kim et al.,

2000).

En general, con un periodo de 24 horas se logra la maduración nuclear del 30-60% de las VG cultivadas. Prolongando el periodo de maduración hasta las 30-48 horas, las tasas de maduración globales incrementan hasta el 50-70% (Chian et al., 2002; Escrich et al., 2012).

Las tasas de fecundación de los ovocitos madurados in vitro fueron superiores al 60%; tasas comparables a las obtenidas con ovocitos recuperados maduros tras la punción ovárica. Por su parte, y al igual que sus homólogos madurados in vivo, el 60-94% de los ovocitos correctamente fecundados se dividieron.

Referente a la calidad de los pre-embiones generados por esta metodología, los resultados, cuando los hay (Chian y Tan 2002; Farsi et al., 2011; Kim et al., 2000; Nogueira et al., 2000; Reichman et al., 2010) fueron variados, mostrando tasas de desarrollo hasta el estadio de 8 células del 20% al 69%. Por su parte, Farsi et al. muestra que la tasa de división a pre-embiones de 4 células, en comparación intra-cohorte, madurada in vivo, no presentó diferencias significativas (Farsi et al., 2011).

Por lo que respecta al potencial de desarrollo in vivo de los pre-embiones generados a partir de ovocitos madurados in vitro y recuperados de ciclos estimulados, Child et al. reportaron tasas de gestación por transfer muy limitadas (4%), de las cuales sólo un 2% culmina con un nacimiento, además de una muy baja tasa de implantación (1.5%; Child et al., 2001). Por otro lado, el trabajo de Reichman et al., también presenta resultados de competencia in vivo a partir de ovocitos madurados in vitro (Reichman et al., 2010).

Algunos autores mostraron que la maduración in vitro de ovocitos inmaduros, obtenidos en asociación a un protocolo de estimulación ovárica controlada estándar, produce ovocitos cuyo potencial de fecundación es limitado y/o presentan una división pre-embionaria deficientes (Kim et al.,

2000). Estos autores consideran que el desarrollo de pre-embiones subóptimo se debe a que los ovocitos inmaduros son probablemente "dismaduros", debido a su exposición intraovárica a niveles suprafisiológicos de gonadotrofinas exógenas. Esta hipótesis explicaría la elevada tasa de aneuploidías (80-90%) observada en pre-embiones generados a partir de ovocitos inmaduros, recuperados en asociación a ciclos de estimulación ovárica controlada estándar (Desciscio et al., 2000; Nogueira et al., 2000).

CONCLUSIONES

La MIV pudiera ser un procedimiento seguro para obtener ovocitos competentes ya que cerca de unos 2000 niños han nacido por esta tecnología sin mostrar ningún tipo de malformación ni retraso en cuanto a su desarrollo, al menos en edades tempranas, mostrando los recién nacidos un peso medio dentro de los valores considerados normales (Son y Tan, 2010).

La MIV de ovocitos humanos podría ser una atractiva alternativa a la estimulación con gonadotrofinas para pacientes que requieran de técnicas de fecundación in vitro. Sin embargo, la mayoría de centros de FIV no ha adoptado la MIV como técnica rutinaria y muchos centros prefieren los protocolos clásicos de estimulación ovárica. Este hecho es probablemente debido a que los protocolos de MIV requieren de una gran experiencia profesional para la recuperación ovocitaria y tratamiento de los ovocitos (Trousseau et al., 1994). Asimismo, una de sus principales ventajas, que originariamente fue el prevenir el síndrome de hiperestimulación ovárica, está actualmente mermado por la existencia de otras estrategias reproductivas para minimizarlo, como por ejemplo, (1) la administración de antagonistas de GnRH para prevenir una luteinización prematura, (2) la administración de un agonista de GnRH en lugar de hCG para inducir la ovulación o (3), la estrategia de vitrificación de ovocitos o pre-embiones a fin de prevenir la manifestación tardía del síndrome de hiperestimulación ovárica en caso de gestación.

El hecho de que existan muy pocos estudios sobre la MIV como rescate ovocitario; es decir, realizando la MIV en aquellos ovocitos reproductivamente desestimados, se debe al supuesto efecto negativo que sobre su competencia pudiera haber ejercido su exposición a dosis altas de gonadotrofinas exógenas, todo lo cual hubiera condicionado a tales ovocitos a no madurar in vivo a su tiempo, consecuencia derivada en una calidad ovocitaria comprometida.

Sin embargo, estudios de nuestro grupo muestran que los ovocitos inmaduros humanos recuperados de ciclos estimulados son competentes nuclearmente y capaces de responder a un estímulo eficiente de activación (señales iniciales de competencia citoplasmática). De nuestros resultados, cabe concluir que la maduración in vitro (MIV) de los ovocitos recuperados de ciclos estimulados es un proceso pre-programado, siendo sólo dependiente del tiempo y existiendo un timing óptimo tanto para la maduración nuclear como para la citoplasmática (Escrich et al., 2012).

A pesar de la posibilidad de que los ovocitos inmaduros no habrían desarrollado su competencia como sus homologos madurados in vivo, los ovocitos inmaduros pueden suponer una oportunidad adicional o única para pacientes con número de MII escasos o nulos en el día de la punción.

BIBLIOGRAFÍA

Cha KY, Han SY, Chung HM, Choi DH, Lim JM, Lee WS, et al. Pregnancies and deliveries after in vitro maturation culture followed by in vitro fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2000; 73:978-983.

Chian R, Tan S. Maturation and developmental competence of cumulus-free immature human oocytes derived from stimulated and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Reproductive biomedicine online* 2002; 5:125-132.

Chian RC, Buckett WM, Tulandi T, Tan SL. Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming

before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 2000; 15:165-170.

Child TJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B, Tan SL. In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries, polycystic ovaries, and women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2001; 76:936-942.

Child TJ, Phillips SJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B, Tan SL. A comparison of in vitro maturation and in vitro fertilization for women with polycystic ovaries. *Obstetrics & Gynecology* 2002; 100:665-670.

De Araujo, Carlos Henrique Medeiros, Nogueira D, de Araujo, Maria Cristina Picinato Medeiros, de Paula Martins W, et al. Supplemented tissue culture medium 199 is a better medium for in vitro maturation of oocytes from women with polycystic ovary syndrome women than human tubal fluid. *Fertil Steril* 2009; 91:509-513.

Desciscio C, Wright DL, Mayer JF, Gibbons W, Muasher SJ, Lanzendorf SE. Human embryos derived from in vitro and in vivo matured oocytes: analysis for chromosomal abnormalities and nuclear morphology. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17:284-292.

Edwards RG. Maturation in vitro of human ovarian oocytes. *The Lancet* 1965; 286:926-929.

Escrich L, Grau N, Mercader A, Rubio C, Pellicer A, Escrivá M. Spontaneous in vitro maturation and artificial activation of human germinal vesicle oocytes recovered from stimulated cycles. *J Assist Reprod Genet* 2011; 28:111-117.

Escrich L, Grau N, de los Santos MJ, Romero JL, Pellicer A, Escrivá MJ. The dynamics of in vitro maturation of germinal vesicle oocytes. *Fertil Steril* 2012; 98:1147-1151.

Fadini R, Dal Canto M, Renzini MM, Milani R, Fruscio R, Cantù MG, et al. Embryo transfer following in vitro maturation and cryopreservation of oocytes recovered from antral follicles during conservative surgery for ovarian cancer. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29:779-781.

Farsi MM, Jorsaraei SGA, Esmaelzadeh

S, Golaipour MJ. In vitro maturation of germinal vesicle oocytes in stimulated intracytoplasmic sperm injection cycles. *Cell Journal (Yakhteh)* 2011; 13:73.

Gras L, McBain J, Trounson A, Kola I. The incidence of chromosomal aneuploidy in stimulated and unstimulated (natural) uninseminated human oocytes. *Hum Reprod* 1992; 7:1396-1401.

Grynberg M, El Hachem H, de Bantel A, Benard J, le Parco S, Fanchin R. In vitro maturation of oocytes: uncommon indications. *Fertil Steril* 2013; 99:1182-1188.

Guler A, Poulin N, Mermillod P, Terqui M, Cognie Y. Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes. *Theriogenology* 2000; 54:209-218.

Kim B, Lee S, Kim K, Han C, Kim J. In vitro maturation, fertilization, and development of human germinal vesicle oocytes collected from stimulated cycles. *Fertil Steril* 2000; 74:1153-1158.

Le Du A, Kadoch IJ, Bourcigaux N, Doumerc S, Bourrier MC, Chevalier N, et al. In vitro oocyte maturation for the treatment of infertility associated with polycystic ovarian syndrome: the French experience. *Hum Reprod* 2005; 20:420-424.

Lee H, Barad DH, Kushnir VA, Shotal-Tal A, Lazzaroni-Tealdi E, Wu Y, et al. Rescue in vitro maturation (IVM) of immature oocytes in stimulated cycle in women with low functional ovarian reserve (LFOR). *Endocrine* 2016; 52: 165-171.

Lin YH, Hwang JL, Huang LW, Mu SC, Seow KM, Chung J, et al. Combination of FSH priming and hCG priming for in-vitro maturation of human oocytes. *Hum Reprod* 2003; 18:1632-1636.

Liu J, Lu G, Qian Y, Mao Y, Ding W. Pregnancies and births achieved from in vitro matured oocytes retrieved from poor responders undergoing stimulation in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 2003; 80:447-449.

Mikkelsen AL, Lindenberg S. Benefit of FSH priming of women with PCOS to the in vitro maturation procedure and the

outcome: a randomized prospective study. *Reproduction* 2001; 122:587-592.

Moschini RM, Chuang L, Poleshchuk F, Slifkin RE, Copperman AB, Barritt J. Commercially available enhanced in vitro maturation medium does not improve maturation of germinal vesicle and metaphase I oocytes in standard in vitro fertilization cases. *Fertil Steril* 2011; 95:2645-2647.

Munne S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1993; 8:2185-2191.

Nogueira D, Staessen C, Van de Velde H, Van Steirteghem A. Nuclear status and cytogenetics of embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Fertil Steril* 2000; 74:295-298.

Oktaç K, Büyük E, Rodríguez-Wallberg K, Sahin G. In vitro maturation improves oocyte or embryo cryopreservation outcome in breast cancer patients undergoing ovarian stimulation for fertility preservation. *Reproductive biomedicine online* 2010; 20:634-638.

Pincus G, Enzmann EV. The Comparative Behavior of Mammalian Eggs in Vivo and in Vitro : I. the Activation of Ovarian Eggs. *J Exp Med* 1935; 62:665-675.

Racowsky C, Kaufman ML, Dermer RA, Homa ST, Gunnala S. Chromosomal analysis of meiotic stages of human oocytes matured in vitro: benefits of protease treatment before fixation. *Fertil Steril* 1992; 57:1026-1033.

Reichman DE, Politch J, Ginsburg ES, Racowsky C. Extended in vitro maturation of immature oocytes from stimulated cycles: an analysis of fertilization potential, embryo development, and reproductive outcomes. *J Assist Reprod Genet* 2010; 27:347-356.

Son WY, Chung JT, Chian RC, Herrero B, Demirtas E, Elizur S, et al. A 38 h interval between hCG priming and oocyte retrieval increases in vivo and in vitro oocyte maturation rate in programmed IVM cycles. *Hum Reprod* 2008a; 23:2010-2016.

Son WY, Chung JT, Herrero B, Dean N, Demirtas E, Holzer H, et al. Selection of the optimal day for oocyte retrieval based

on the diameter of the dominant follicle in hCG-primed in vitro maturation cycles. *Hum Reprod* 2008b; 23:2680-2685.

Son WY, Tan SL. Laboratory and embryological aspects of hCG-primed in vitro maturation cycles for patients with polycystic ovaries. *Hum Reprod Update* 2010; 16:675-689.

Trounson A, Wood C; Kausche A. In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil Steril* 1994; 62:353-362.

Veeck LL, Wortham JW, Jr, Witmyer J, Sandow BA, Acosta AA, Garcia JE, et al. Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1983; 39:594-602.

Yoon H, Yoon S, Son W, Lee S, Park S, Im K, et al. Clinical assisted reproduction: pregnancies resulting from in vitro matured oocytes collected from women with regular menstrual cycle. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18:325-329.

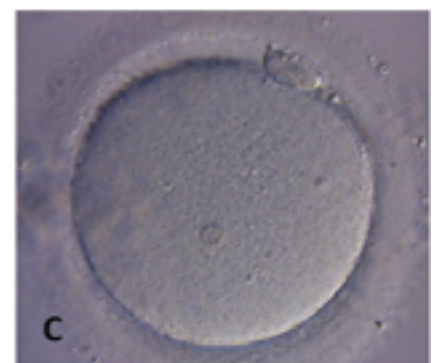
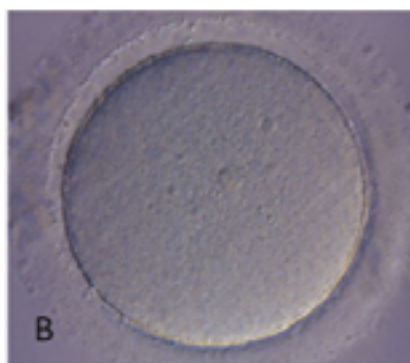
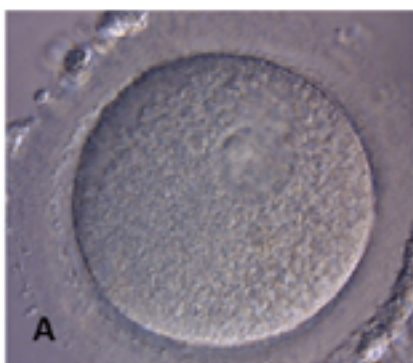


Figura 1. Ovocito madurado in vitro en distintos estadios. A. En Vesícula Germinal. B. En Metafase I. C. En Metafase II.

FORMACIÓN CONTINUADA

Autores	Etiología pacientes	Tratamientos estimulación ovárica	Horas MIV	Tasa de maduración nuclear	Tasa Fecundación	Tasa División	Tasa Gestación	Tasa Implantación
Cha et al., 2000	PCO	Natural	48	62.2%	68%	88%	27.1%	6.9%
Chian et al., 2000	PCO	Ciclo natural + hCG (36hrs)	24	78.2%	90.7%	94.9%	38.5%	42.8%
			48	5.9%				
			Total	84.3%				
Yoon et al., 2001	Ovarios normales	Natural	24	40.7%	72.6%	89%	ND	ND
			48	38.8%				
			56	2.8%				
			Total	74.3%				
Lin et al., 2003	PCO	FSH + hCG (36 hrs)	24	43.2%	75.8%	89.4%	31.4%	9.7%
			48	33.3%				
			Total	76.5%				
		NO FSH + hCG (36 hrs)	24	39.2%	69.5%	88.1%	36.4%	11.3%
			48	62.7%				
			Total	71.9%				
Le Du et al., 2005	PCO	Ciclo Natural + hCG (36 hrs)	24	54.2%	70.1%	96.3%	22.5%	10.9%
			48	8.8%				
			Total	63.1%				
Son et al., 2008	PCO	Ciclo Natural + hCG (35hrs)	24	36.0%	78.5%	96.5%	25%	9.6%
			48	26.3%				
			Total	62.3%				
		Ciclo Natural + hCG (38hrs)	24	46.3%	79.8%	95.5%	40%	15.6%
			48	21.9%				
			Total	68.2%				

Tabla 1. Resultados bibliográficos de ciclos de MIV de ovocitos recuperados de ovarios No-Estimulados.

Autores	Etiología pacientes	Tratamientos estimulación ovárica	Medio Cultivo	Horas MIV	Tasa Maduración	Tasa Fecundación	Tasa División
Kim et al. 2000	Ovarios normales	(FSH-hMG) + hCG (36 hrs)	Propio	44	66.7%	51.8%	84.5%
Nogueira et al. 2000	Ovarios normales	(GnRHa + HMG) + hCG (36 hrs)	B2	24-30	72.0%	70.3%	78.9%
Chian and Tan., 2002	Ovarios Normales	Protocolo largo + hCG (36hrs)	TCM-199	24	34.0%	83.3%	96.7%
				48	21.7%	69.6%	93.8%
				Total	55.7%	78.0%	95.7%
			Medio MIV propio	24	50.5%	88.9%	100%
				48	25.2%	81.5%	100%
				Total	75.7%	86.4%	100%
Reichman et al., 2010	Ovarios Normales	Variado + hCG (36 hrs)	Medio MIV SAGE	24	35.1%	60.0%	61.5%
Farsi et al., 2011	Ovarios Normales	HMG + hCG (36-38 hrs)	G1 Vitrolife	24-30	70%	65%	70%
Escrich et al., 2012	Ovarios Normales	Variado + hCG (36 hrs)	CCM Vitrolife	24	62.6%	61.3%	ND
				40	26.3%	34.6%	
				Total	88.9%	53.9%	

Tabla 2. Resultados bibliográficos de ciclos de MIV de ovocitos recuperados de ovarios Estimulados.



RI Witness™

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



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 - 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

KIVEX BIOTECH LTD



www.embiol.com

G - TL

PRIMER MEDIO ÚNICO DISEÑADO
ESPECÍFICAMENTE PARA TIME-LAPSE



Vitrolife 

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 

CULTIVO A BLASTOCISTO EN LA REPRODUCCIÓN ASISTIDA

BLASTOCYST CULTURE IN ASSISTED REPRODUCTION

Adrián Guillermo Socas
adri.gs.1191@gmail.com

Resumen: El uso de blastocistos en los tratamientos de reproducción asistida muestra multitud de ventajas con respecto al empleo de embriones en etapa de división. Tales ventajas son; menores tasas de embarazos múltiples, de abortos tempranos y del número de embriones que se criopreservan sin posibilidad posterior de desarrollo e implantación, así como un aumento de la tasa de implantación, embarazo y de nacimientos vivos. Actualmente muchas clínicas de reproducción asistida siguen sin ver el cultivo prolongado de embriones como una solución definitiva y de trabajo diario ante todo tipo de pacientes por tanto, el propósito de esta revisión fue el de proporcionar las evidencias existentes acerca de las ventajas, inconvenientes y necesidades del uso de blastocistos en los tratamientos de reproducción asistida.

Palabras clave: Blastocisto, embrión, *in vitro*, reproducción asistida, transferencia.

Summary: The use of blastocysts in assisted reproductive treatments shows many advantages over the use of cleavage stage embryos. Such advantages are lower rates of multiple pregnancies, early miscarriages and the number of cryopreserved embryos without further possibility of development and implantation, as well as an increase in implantation rate, pregnancy and take home healthy babies. Currently many of assisted reproduction clinics continue without seeing the prolonged culture of embryos as a definitive solution and daily work to all patients. Therefore the purpose of this review was to provide existing evidence about the advantages, disadvantages and needs for the use of blastocysts in assisted reproductive treatments.

Keywords: Blastocyst, embryo, *in vitro*, assisted reproduction, transfer.

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la salud como "...estado de completo bienestar físico, mental y social, y no solamente la ausencia de afecciones o enfermedades", por ello, aquellos problemas relacionados con la infertilidad deben ser tratados desde el punto de vista psicológico y médico para intentar solventarlos y conseguir así, una salud reproductiva plena.

Actualmente los tratamientos de Reproducción Asistida (RA) tienen una importancia tal, que en el año 2012 aproximadamente el 1,5% de los recién nacidos vivos en Estados Unidos fueron gracias a la utilización de estas técnicas. Esta creciente necesidad del uso de tratamientos de RA en nuestros días es debida principalmente al ritmo y estilo de vida al que estamos sometidos, sobre todo en los países más industrializados, donde las personas se ven obligadas a posponer su maternidad o paternidad hasta edades cada vez más avanzadas lo que conlleva una disminución de la fertilidad, sobre todo en el caso de la mujer. Varios trabajos han demostrado

que el aumento de edad en la mujer no solo afecta a la calidad morfológica de sus óvulos, sino que también aumenta la probabilidad de presentar aneuploidías en estos (Gardner y Schoolcraft, 1998). Pero la edad también pasa factura en el caso del hombre, donde podemos ver como su fertilidad se ve reducida con el paso de los años (Belloc et al., 2014).

La infertilidad en ambos sexos depende de varios factores. En el caso de la infertilidad femenina, son muchos los estudios que han demostrado la existencia de varios factores ambientales que tienen repercusión sobre la fertilidad como son, la ansiedad y depresión (Smeenk et al., 2001), el tabaquismo (Boomsma y Macklon, 2006), la obesidad (Dessolle et al., 2011), etc. En la actualidad, estos factores son muy comunes en nuestra sociedad, lo que provoca que la tasa de infertilidad aumente con el paso de los años.

Para intentar incrementar la tasa de embarazo de las pacientes sometidas a tratamientos de RA muchos profesionales han propuesto la transferencia de blastocistos, los cuales mejoran la tasa

de implantación y embarazo, reduciendo al mismo tiempo la tasa de embarazo múltiple debido a que se transfiere menor cantidad de embriones pero, ¿es la transferencia de blastocistos realmente tan efectiva como se ha dicho? A lo largo de este estudio se abordarán diferentes aspectos de los blastocistos, con el fin de proporcionar las evidencias existentes acerca de las ventajas, inconvenientes y necesidades del uso de blastocistos en los tratamientos de RA.



Figura 1. Morfología de un blastocisto, (ASEBIR)

¹ http://www.sart.org/Society_for_Assisted_Reproductive_Technology_Releases_New_Annual_Report_on_In_Vitro_Fertilization

BLASTOCISTOS

Cuando hablamos de blastocisto se debe pensar en un embrión en D+5 o D+6, dependiendo de las condiciones *in vitro*, del sistema de cultivo utilizado y de las características del mismo. Los blastocistos son el resultado de una ordenación espacial de las blastómeras del embrión, caracterizándose por presentar un estrato envolvente de células o trofoectodermo (TE), una cavidad interna o blastocele y un cúmulo de células en uno de sus polos denominada masa celular interna (MCI).

SISTEMAS DE CLASIFICACIÓN DE BLASTOCISTOS

Existen diversos sistemas de clasificación para los blastocistos, pero el método más usado es el de su evaluación de acuerdo a su morfología. Gardner y Schoolcraft (1999) propusieron un sistema de clasificación que tiene en cuenta tres parámetros morfológicos; la expansión del blastocele y la forma tanto de la MCI como la cohesión del TE.

Para esta clasificación, Gardner y Schoolcraft (1999) dieron una puntuación numérica (1-6) a los blastocistos según su expansión blastocélica y su estado de eclosión (**Figura 2**).

Por lo tanto, el código para la clasificación de los blastocistos incluirá un número que hace referencia a la expansión blastocélica y dos letras, donde la primera hace referencia a la MCI y la segunda al TE.

El método de clasificación propuesto por Gardner y Schoolcraft (1999) no es el único, ya que existen otros menos extendidos, como el propuesto por Kova i et al. (2004), donde se describen cuatro parámetros morfológicos; expansión blastocélica, morfología de la MCI, cohesión del TE y presencia de blastómeras o fragmentos excluidos de la formación de blastocistos.

A pesar del interés mostrado hace tiempo por la morfología tanto de la MCI como del TE, Ahlström et al. (2011) encontraron que la morfología del TE es un parámetro mucho más predictivo del potencial implantatorio del embrión. Además, Ebner et al. (2004) vieron diferencias significativas en las tasas de implantación de blastocistos cuando la localización de la zona de eclosión se posiciona en la región próxima a la MCI o sobre la región del TE (67% vs. 41%), siendo mayor la tasa de implantación cuando la zona de eclosión se posiciona cerca de la MCI.

los medios de cultivo han evolucionado enormemente desde los comienzos de las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA).

Actualmente disponemos de dos tipos de medios de cultivo, los secuenciales y los únicos. El cultivo secuencial consiste en la utilización de dos medios de cultivo con composiciones químicas distintas. Un primer medio trata de imitar las condiciones bioquímicas a las que sería sometido el embrión de forma natural hasta el D+3, el cual se encontraría recorriendo las trompas de Falopio para posteriormente, trasladarlo al segundo medio, hasta el D+5 o D+6 de desarrollo, días en los cuales el embrión ya se encontraría en el útero (**Figura 4**). Es por ello que dependiendo de la etapa en la que se encuentre el embrión, este requerirá diferentes nutrientes (**Tabla I**) (Artini et al., 2004).

Por tanto, el uso de los medios secuenciales aportan a los embriones todas las demandas dependiendo de sus diferentes fases de desarrollo, tratando de imitar así, el medio natural en lo posible.

Por otro lado, en la actualidad disponemos de los medios de cultivo únicos modernos, los cuáles se están usando cada vez más. Este tipo de medios no requiere de una renovación a los embriones en D+3, sino que pueden soportar el cultivo prolongado de embriones en ellos hasta la etapa de blastocisto. Algunos autores como Hardarson et al. (2015) han reportado tasas similares de formación de blastocistos con el uso de los medios de cultivo únicos en comparación con los embriones cultivados en medios secuenciales. Además los medios únicos tienen la ventaja de que son más económicos ya que solo se requiere un tipo de medio, repercutiendo asimismo en una reducción del tiempo de trabajo por paciente (VerMilyea et al., en prensa).

Lo que es evidente es que las condiciones y medios de cultivo no mejoran el potencial inherente de desarrollo de los embriones pero si pueden reducir su viabilidad, por lo que es importante que un medio de cultivo sea capaz de reducir en lo posible el estrés al que los

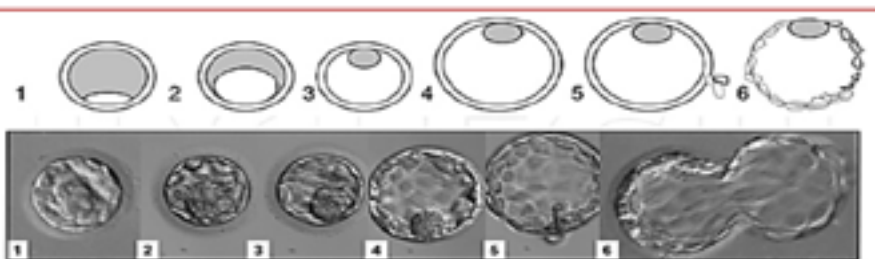


Figura 2. Diferentes puntuaciones para la expansión del blastocele: 1.- La cavidad blastocélica representa menos de la mitad del volumen del embrión; 2.- El blastocele es más de la mitad del volumen del embrión; 3.- Blastocisto completo, el blastocele llena completamente el embrión; 4.- Blastocisto expandido, la cavidad es mayor que el embrión, hay adelgazamiento de la zona pelúcida; 5.- Eclosión del blastocisto, el trofoectodermo comienza a romperse; 6.- Blastocisto completamente liberado de la zona pelúcida (Gardner y Schoolcraft, 1999).

En el caso de la MCI y del TE, la clasificación se hace con el uso de tres letras (A, B o C), donde la MCI solo se puede evaluar en aquellos blastocistos con un desarrollo completo (los que tienen una clasificación del 3 al 6) (**Figura 3**).

Desarrollo de los medios de cultivo y su importancia para obtener blastocistos

Para que se pueda pensar en una transferencia de blastocisto en la actualidad, tenemos que recordar que

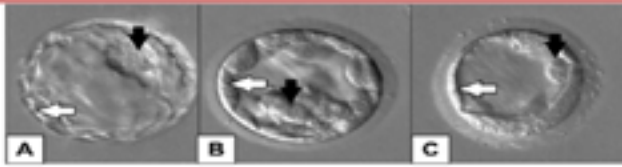


Figura 3. Clasificación de la MCI y del TE.

MCI (flecha negra): A.- Muchas células, todas apretadas; B.- Varias células, ligeramente agrupadas; C.- Muy pocas células.

TE (flecha blanca): A.- Muchas células que forman una capa cohesiva; B.- Pocas células que forman un epitelio suelto; C.- Muy pocas células grandes (Gardner y Schoolcraft, 1999).

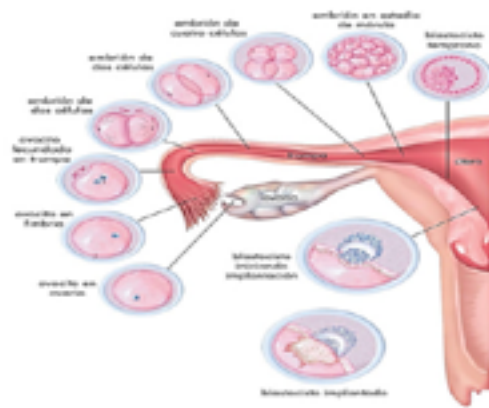


Figura 4. Representación del recorrido y etapas de desarrollo de un embrión. Tomada de <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/>

Component	Oviduct	Uterus
Glucose concentration	0.5 mM	3.15 mM
Pyruvate concentration	0.32 mM	0.10 mM
Lactate concentration	10.5 mM	5.2 mM
Oxygen concentration	8%	1.5%
Carbon dioxide concentration	12%	10%
pH	7.5	7.1

Tabla I. Diferencias bioquímicas entre oviducto y útero en mamíferos (Lane y Gardner, 2007).

embriones son expuestos en condiciones *in vitro* (Gardner y Schoolcraft, 1998; Lane y Gardner, 2007).

REQUISITOS E INDICACIONES PARA UN CULTIVO HASTA LA ETAPA DE BLASTOCISTO

Para realizar una valoración de la calidad embrionaria existen criterios como el consumo metabólico, el estudio de aneuploidías, además de otros parámetros que están demostrando su eficacia y potencialidad futura (ASEBIR). Sin embargo la valoración morfológica continúa siendo el sistema más extendido y eficiente (Scott, 2003; ASEBIR).

Hay que tener en cuenta que para una correcta catalogación embrionaria según su morfología se necesita de un seguimiento diario a lo largo del desarrollo del embrión para posteriormente decidir cómo ponderarlos. Para poder clasificar adecuadamente al embrión disponemos de varias opciones; realizar una valoración por puntuación (Fisch et al., 2001; Fisch et al., 2003), por categorías o recurrir al uso del time-lapse. Debido a la mayor dificultad para consensuar una ponderación adecuada de cada uno de los parámetros, y a que no todos los laboratorios disponen de la tecnología time-lapse, la segunda opción es el método más usado y fácil de comprender.

Se debe tener en cuenta que, a pesar de la mejor clasificación que se pueda hacer de los embriones, si no nos encontramos ante un endometrio receptivo, esta selección para realizar una transferencia puede ser inútil y provocar la pérdida de este embrión con alto potencial implantatorio (Shapiro et al., 2011).

2.3.1. Embriones de buena calidad para prolongar el cultivo hasta la etapa de blastocisto

Uno de los problemas más importantes del cultivo de embriones hasta la etapa de blastocisto, es la incapacidad de predecir con seguridad si los embriones en cultivo llegarán a desarrollarse hasta esta etapa a pesar de ser embriones de buena calidad. Thomas et al. (2010) publicaron en su trabajo que solo el 35% de los cigotos alcanzaron la fase de blastocisto en el quinto día. La relación entre la calidad del embrión en la etapa de división y la calidad del blastocisto fue estudiada por Rjinders y Jansen (1998), llegando a la conclusión de que el valor predictivo de la morfología del embrión en D+3 respecto a la formación de blastocisto posterior es limitada, porque sólo el 51% de los embriones que hubiesen sido preseleccionados para la transferencia en el D+3 podrían llegar a blastocistos en el D+5 (Balaban et al., 2001).

Existen dos parámetros para la toma de decisión acerca de la realización de un cultivo prolongado hasta el D+5, o por el contrario, realizar la transferencia o vitrificación el D+3. Uno de estos parámetros es la cantidad de embriones disponibles, y otro, es el número y calidad de las blastómeras de los embriones en el D+3. Con respecto a la cantidad de embriones disponibles no hay un claro consenso, pero algunos autores como Milki et al. (1999) proponen que se debe disponer de al menos 4 embriones de buena calidad (con 8 blastómeras y una fragmentación reducida en D+3) para realizar un cultivo prolongado hasta el D+5. En cambio, Racowsky et al. (2000) propone que el número mínimo de embriones de buena calidad para prolongar el cultivo hasta la etapa de blastocisto sea de 3.

Como ya se comentó anteriormente, para prolongar el cultivo de embriones hasta

la etapa de blastocistos no solo debemos fijarnos en el número de embriones disponibles y en el número de sus blastómeras, sino también en la calidad de estas. Para ello, ASEBIR ha propuesto una gradación donde, embriones de buena calidad son considerados aquellos clasificados con las letras A y B.

2.3.2. Embriones con un desarrollo temporal anormal

Los embriones con un desarrollo temporal anormal son aquellos con un ritmo de división de sus blastómeras más rápido o lento de lo normal. Alrededor de este tipo de embriones hay una gran controversia y disparidad de opiniones acerca de su calidad. Mesut et al. (2011) encontraron que los embriones con desarrollo tardío tenían una tasa de implantación más

posteriormente en un nuevo ciclo de preparación endometrial. Debido a lo anteriormente expuesto, estos autores no aconsejan elegir embriones de desarrollo lento para realizar una transferencia.

Por otro lado, los embriones con un desarrollo rápido no se suelen elegir para la transferencia si existen otros con características similares y de desarrollo normal, pero si un embrión se divide antes de tiempo no tiene por qué significar que este sea de mayor o menor calidad que otro embrión con un desarrollo normal. En el estudio de Luna et al. (2008) se demostró que la mayor tasa de formación de blastocistos provenía de embriones con una velocidad de desarrollo normal, seguido por los embriones con una velocidad de desarrollo rápida (Tabla II).

TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN D+5.

La superioridad de la transferencia de embriones en D+5 ha sido demostrada por multitud de publicaciones que muestran ventajas como; una tasa de implantación y de embarazo mayor que las transferencias en D+2 y D+3, una reducción de la incidencia de abortos tempranos, del número de embriones transferidos y de la tasa de embarazos múltiples (Tabla IV) (Gardner et al., 2004; Levitas et al., 2004; Papanikolaou et al., 2006).

La figura 5 muestra el aumento progresivo de la tasa de embarazo tras una transferencia según evoluciona el embrión en el tiempo, hasta llegar a la etapa de blastocisto donde se encuentra la probabilidad máxima de embarazo.

Embryo developmental stage reached on day 5 classified according to day 3 cell number.			
	Slow cleavage (≤ 6 cells)	Intermediate cleavage (7–9 cells)	Fast cleavage (≥ 10 cells)
Blastocysts	315 (38%)	1804 (72.7%)	117 (54.2%)
Morula	141 (17%)	271 (10.9%)	9 (4.2%)
Arrested	374 (45.1%)	408 (16.4%)	90 (41.7%)

Tabla II. Etapa de desarrollo del embrión alcanzado en D+5, clasificado de acuerdo con el número de blastómeras en D+3. Se puede observar un porcentaje más alto de formación de blastocistos provenientes de embriones de desarrollo rápido que de desarrollo lento, pero el mayor porcentaje sigue siendo el de embriones con desarrollo normal (Luna et al., 2008). Nota: $P < .0001$.

baja que los embriones con desarrollo normal, por lo que se especuló acerca de si estos poseen defectos inherentes que provoquen un retraso en las divisiones posteriores de sus blastómeras, siendo indetectables estos problemas si únicamente realizamos un seguimiento morfológico. Este tipo de errores en el genoma embrionario pueden explicar la alta incidencia de abortos tempranos observados en embriones criopreservados en D+6 y transferidos

Puede que los embriones de desarrollo rápido tengan una mala reputación infundada ya que hay evidencias de la obtención de blastocistos de alta calidad (4AA y 5AA) que provienen en mayor proporción de embriones D+3 rápidos (Tabla III). Lo que parece más importante en estos casos, para determinar el mayor potencial implantatorio y de desarrollo de un embrión, es su seguimiento diario adecuado y no una única evaluación en D+3 (Fisch et al., 2003).

Esto es debido a que cuanto más avance el cultivo de embriones en el tiempo, mayor será el efecto discriminatorio de embriones de baja calidad. En cambio, desde el D+3 hasta el D+5 se pierde potencial acumulativo debido a que al seleccionar mejor los embriones se dispone de menor cantidad de embriones de la misma cohorte.

High quality blastocyst formation rates according to day 3 cleavage group.			
	Slow cleavage	Intermediate cleavage	Fast cleavage
Blastocyst 4AA or 5AA	2/315 (0.63%)	127/1804 (7.03%)	15/117 (12.82%)

Tabla III. Tasa de formación de blastocistos de alta calidad de acuerdo con el grupo de embriones D+3 en etapa de división. Esta tabla muestra un porcentaje de blastocistos de alta calidad más elevado provenientes de embriones de desarrollo rápido (Luna et al., 2008). Nota: $P < .0001$.

USO DE BLASTOCISTOS EN LAS TRA

El cultivo prolongado y uso de blastocistos en la RA tiene una serie de ventajas y desventajas que se nombraran a continuación.

Inconvenientes de los blastocistos en las TRA

El mayor problema con que se encuentran los embriólogos a la hora de prolongar el cultivo de embriones hasta la etapa de blastocistos es el riesgo de cancelación de la transferencia embrionaria a causa de la posibilidad de que ninguno de estos embriones, a priori de buena calidad, sean capaces de llegar a esta etapa (Levitas et al., 2004). Este inconveniente es debido posiblemente a que los medios y métodos de cultivo *in vitro* sean subóptimos para el correcto desarrollo de los embriones (Papanikolaou et al., 2008).

Otro de los principales problemas que presenta la transferencia de blastocistos es la incidencia de gemelos monocigóticos (Tabla V). Este hecho se cree que puede deberse a una serie de alteraciones

que ocurren en la zona pelúcida de los embriones al ser sometidos a un cultivo prolongado (Behr et al., 2000; Tarlatzis et al., 2002).

A pesar de la aparente ventaja de seleccionar los mejores embriones mediante un cultivo prolongado, este método no nos asegura que los embriones que consigan llegar hasta la etapa de blastocisto sean realmente aptos para la formación de un feto, ya que puede que éstos presenten aneuploidias (Kolibianakis y Devroey, 2002), aunque claro está, en una menor proporción (Staessen et al., 2004).

El cultivo de blastocistos tiene el inconveniente de la necesidad de unos recursos de laboratorio adecuados, como es el caso de un número mínimo de incubadoras, ya que la capacidad de las incubadoras para mantener un microambiente estable influye significativamente en la formación de buenos embriones en etapas tempranas y la posterior tasa de formación de blastocistos (Fujiwara et al., 2007). Para evitar este problema existe la posibilidad de disponer de sistemas de monitorización

que no impliquen la extracción de los embriones de su atmósfera controlada, como es el caso de la tecnología time-lapse (Neuber et al., 2003), acompañado del uso de medios de cultivo únicos. Este sistema incluye dentro de la incubadora una lente para la captura de imágenes, las cuales sirven para crear posteriormente un video con el desarrollo del embrión a alta velocidad que permite conocer por tanto, la evolución de los embriones a la vez que los protege de los cambios de temperatura, efectos nocivos de la luz y de las fluctuaciones de gases que provocaría su extracción de la incubadora para su visionado. Toda esta tecnología permitiría una mejora de las condiciones de cultivo, reduciendo el estrés al que es sometido el embrión durante su cultivo *in vitro*, pero esta instrumentación supone un presupuesto muy elevado para los centros de reproducción asistida (Rienzi et al., 2010).

Otro punto a tener en cuenta, es que la transferencia de blastocistos no siempre tiene los resultados esperados ya que, para obtener las mejores tasas de embarazo se deben seleccionar poblaciones de pacientes tales como

Incidencia de gemelos monocigóticos	D+3 (%)	D+5 (%)
(Rijnders et al., 1998)	0,68	2,7
(Milki et al., 2003)	2	5,6
(Da Costa et al., 2001)	0,7	3,9
(Sharara y Abdo., 2010)	0	1,57

Tabla V. Comparación de la tasa de gestación de gemelos monocigóticos entre D+3 y D+5.

receptoras de ovocitos donados, jóvenes, con fallos de implantación recurrentes, etc. (Prabhleen et al., 2013; Santos et al., 2003; Schoolcraft y Gardner, 2000).

Un dato curioso de la transferencia de blastocisto es el reporte de una mayor tasa de nacimiento de varones, dato que debe ser informado a los pacientes que se encuentran a la espera de una transferencia de blastocistos (Chang et al., 2009).

6.2. Ventajas de los blastocistos en las TRA

Una de las mayores ventajas de la transferencia de blastocistos, como ya se explicó con anterioridad, es la mejor coordinación entre el embrión y el endometrio, lo que provocaría un

probabilidad de que estos no tengan posibilidad alguna de implantación debido a fallos relacionados con su genoma (Kolibianakis y Devroey, 2002). La realización de un cultivo prolongado hasta D+5 o D+6 aumenta por tanto la discriminación a favor de aquellos embriones con una menor cantidad de defectos deletéreos en su genoma (Graham et al., 2000), siendo más sensible y específica la predicción de viabilidad de un embrión en una etapa tardía de desarrollo antes que en una etapa temprana (Rehman et al., 2007).

Debido a lo anterior, en el caso de pacientes con fallos de implantación recurrente, la transferencia de blastocistos parece ser la mejor opción (Levitas et al., 2004), puesto que la causa más común parece ser las aneuploidías en los embriones

et al., 2006; Yoon et al., 2001; Guerif et al., 2011), pero manteniendo al mismo tiempo una tasa de embarazo bastante alta (Gardner et al., 2000). Es importante reducir la incidencia de embarazos múltiples en pacientes sometidas a TRA, ya que este tipo de embarazo tienen numerosos riesgos como; parto prematuro, bajo peso del neonato, aumento de la mortalidad y morbilidad perinatal, etc. (Marsh et al., 2012).

En la **tabla VI** se puede observar la mayor tasa de embarazo y la disminución de la tasa de abortos tras la transferencia de un solo blastocisto en comparación con un embrión en etapa de división, independientemente de su calidad, lo que nos vuelve a indicar que la transferencia de blastocistos es el método más adecuado.

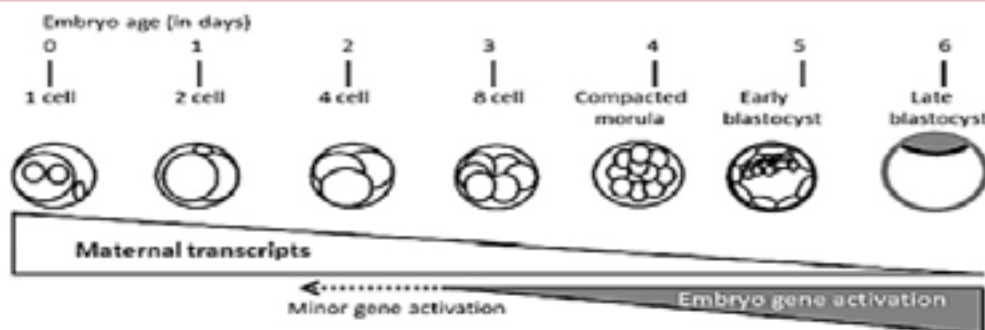


Figura 6. Cronología del desarrollo preimplantatorio de un embrión humano. La activación del genoma del embrión se produce principalmente entre las etapas de 4 y 8 células (Sengupta y Ghosh, 2014).

aumento en la tasa de embarazo y una reducción de la pérdida de embriones viables transferidos en D+3.

A partir del D+3 de desarrollo, el embrión activa su propio genoma (**Figura 6**), por lo que al seleccionar embriones en D+2 o D+3 para la transferencia existe una alta

(Boomsma y Macklon., 2008; Goodman et al., 2008).

La transferencia de blastocisto tiene como principal objetivo la reducción del número de embriones que se transfieren en las TRA y así por tanto, de la tasa de embarazos múltiples (Papanikolaou

Thurin et al. (2004) en su estudio, también muestran la ventaja de la transferencia de blastocistos ya que, la tasa de embarazos acumulativa no fue significativamente diferente tras la transferencia de un blastocisto en fresco frente a la transferencia de dos embriones en etapa de división (38,8%

Day of ET	Day 3	Day 5	Day 3	Day 5
Embryo quality	Excellent	Excellent	Moderate	Moderate
No. of patients (%)	86 (86.9)	76 (59.4)	13 (13.1)	52 (40.6)
Age (y)	31.7 ± 2.5	31.7 ± 3.0	31.6 ± 4.3	31.9 ± 2.5
No. of IVF attempts	86	76	13	52
No. of oocytes	902	942	131	578
No. of zygotes	625 (69.3%)	629 (66.8)	82 (62.6%)	398 (68.8%)
No. of embryos on day 3	607	610	79	368
Grades I and II (% of day 3 embryos)	299 (49.3%)	294 (48.2)	0	164 (44.6%)
Grades III and IV (% of day 3 embryos)	308 (50.7%)	316 (51.8)	79 (100%)	204 (55.4%)
No. of blastocysts (% of day 3 embryos)		279 (45.7)		91 (24.7%)
Grade A (% of day 3 embryos)		138 (22.6)		0
Grade B (% of day 3 embryos)		141 (23.1)		91 (24.7%)
No. of ETs	86	76	11	42
No. of pregnancies	28	37	3	15
No. of miscarriages	6 (21.4%)	5 (13.5%)	2 (66.6%)	4 (26.7%)
No. of ongoing pregnancies/cycles	22 (25.6%)*	31 (40.8%)*	1 (7.7%)	11 (21.2%)
No. of ongoing pregnancies/ETs	22 (25.6%)	31 (40.8%)	1 (9.1%)**	11 (26.2%)**

Tabla VI. Embarazos en curso después de SET (single embryo transfer) en el D+3 y SBT (single blastocyst transfer) en relación con la calidad de los embriones transferidos. Se muestra la ventaja de los blastocistos frente a los embriones en etapa de división, con un aumento significativo de la tasa de embarazos, de la tasa de embarazos por ciclo y de la tasa de embarazos por transferencia selectiva de embriones (Zech et al., 2007). * ; ** $P < .05$.

vs 42,9%, $P < 0,30$), pero si tuvo lugar una importante disminución del número de nacimientos múltiples (0,8% vs 33,1%).

Otra de las ventajas de la transferencia de blastocistos es la disminución del número de embarazos ectópicos donde nos encontramos ante una incidencia del 2,1% cuando los embriones son transferidos en D+3 contra un 1,6% entre los embarazos con transferencia de embriones en D+5 (Smith et al., 2013). Esta disminución en el número de embarazos ectópicos al transferir blastocistos se cree que puede ser debido al mayor diámetro que presentan los blastocistos con respecto a los embriones en etapa de división, lo cual dificulta la entrada y alojamiento del embrión en las trompas de Falopio (Barrenetxea et al., 2005).

Ante el riesgo de hiperestimulación ovárica o simplemente para conservar los embriones sobrantes ante posibles futuras transferencias, el exceso de embriones se puede convertir en un problema debido a que la vitrificación de estos requiere de tiempo, material y espacio en bancos criogénicos que se traduce en pérdidas económicas, ya que muchos de estos embriones vitrificados antes de la etapa de blastocisto no tienen el potencial adecuado para llegar

hasta esta etapa. Para solucionar este problema, se recomienda vitrificar solo blastocistos consiguiendo así, un ahorro de tiempo, medios y de espacio en los bancos criogénicos (Mesut et al., 2011; Cruz et al., 1999; Papanikolaou et al., 2008).

Lo que queda claro es que existen evidencias de la mejora en la implantación, embarazo y tasas de nacidos vivos después de la transferencia de blastocistos en comparación con la transferencia de embriones en etapa de división (Reh et al., 2010; Zech et al., 2007), especialmente en el caso de pacientes con buen pronóstico (Papanikolaou et al., 2005; Papanikolaou et al., 2006).

CONCLUSIONES

Un cultivo prolongado de embriones necesita de una instrumentación y condiciones de laboratorio específicas y adecuadas.

Para realizar un cultivo de blastocistos se debe disponer de una cohorte embrionaria mínima de buena calidad.

La transferencia de blastocistos aumenta significativamente la tasa de gestación.

La tasa de abortos tempranos se ve reducida con la transferencia de blastocistos.

La transferencia de embriones en etapa de blastocisto reduce significativamente el número de embriones a criopreservar y disminuye la cantidad de embriones almacenados en los bancos de las clínicas de reproducción asistida.

La tasa de embarazo múltiple se ve reducida con la utilización de la transferencia electiva de un solo embrión (TESE-1).

CONCLUSIONS

Prolonged embryo culture needs specific and appropriate laboratory instrumentation and conditions.

To realize a prolonged embryo culture to the blastocyst stage, it is necessary to have a minimum embryo cohort of good quality.

Blastocyst transfer significantly increases pregnancy rate, while reducing the cumulative pregnancy rate.

Early miscarriage rate is reduced with blastocyst transfer.

Embryo transfer in blastocyst stage significantly reduces the number of cryopreserved embryos and decreases the amount of stored embryos in assisted reproduction banks.

Multiple pregnancy rate is reduced with the use of elective single embryo transfer (ESET-1).

AGRADECIMIENTOS

A mi familia,

a Alexander Gómez, Idaira Martín y Verónica Almeida,

a mis tutoras, Dra. Delia Báez y Dra. Aixa Bello,

a la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital Universitario de Canarias, en especial a la Dra. Raquel Blanes.

BIBLIOGRAFÍA

Ahlström, A., Westin, C., Reismer, E., Wikland, M. y Hardarson, T. 2011. Trophoctoderm morphology: an important parameter for predicting live birth after single blastocyst transfer. *Hum Reprod.* 26(12): 3289-3296.

Artini, P.G., Valentino, V., Cela, V., Cristello, F., Vitè, A. y Genazzani, A.R. 2004. A randomized control comparison study of cultura media (HTF versus P1) for human in vitro fertilization. *Obstetrics & Gynecology.* 2: 122-125.

Balaban, B., Urman, B., Alatas, C., Mercan, R., Aksoy, S. y Isiklar, A. 2001. Blastocyst-stage transfer of poor-quality cleavage-stage embryos results in higher implantation rates. *Fertil Steril.* 75(3): 514-518.

Barrenetxea, G., López de Larruzea, A., Ganzabal, T., Jiménez, R., Carbonero, K. y Mandiola, M. 2005. Blastocyst culture after repeated failure of cleavage-stage embryo transfers: a comparison of day 5 and day 6 transfers. *Fertil Steril.* 83(1): 49-53.

Behr, B., Fisch, J.D., Racowsky, C., Miller, K., Pool, T.B. y Milki, A.A. 2000. Blastocyst-ET and monozygotic twinning. *J Assist Reprod Genet.* 17: 349-351.

Belloc, S., Hazout, A., Zini, A., Mervielc, P., Cabryc, R., Chahined, H., Copinc, H.,

Benkhalifac, M. 2014. How to overcome male infertility after 40: Influence of paternal age on fertility. *Maturitas* 78: 22-29.

Boomsma, C.M. y Macklon, N.S. 2006. What can the clinician do to improve implantation? *Reproductive BioMedicine* 13(6): 845-855.

Boomsma, C.M. y Macklon, N.S. 2008. Does glucocorticoid therapy in the peri-implantation period have an impact on IVF outcomes?. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 20(3): 249-256.

Chang, H.J., Lee, J.R., Jee, B.C., Suh, C.S. y Kim, S.H. 2009. Impact of blastocyst transfer on offspring sex ratio and the monozygotic twinning rate: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 91: 2381-2390.

Cruz, J.R., Dubey, A.K., Patel, J., Peak, D., Hartog, B. y Gindoff, P.R. 1999. Is blastocyst transfer useful as an alternative treatment for patients with multiple in vitro fertilization failures? *Fertil Steril.* 72(2): 218-220.

da Costa, A.L., Abdelmassih, S., de Oliveira, F.G., Abdelmassih, V., Abdelmassih, R., Naggy, Z.P. y Balmaceda, J.P. 2001. Monozygotic twinning and transfer at the blastocyst stage after ICSI. *Hum Reprod* 16: 333-336.

Dessolle, L., Fréour, T., Ravel, C., Jean, M., Colombel, A., Darai, E., y Barrière, P. 2011. *Human Reproduction*, 26(5): 1220-1226.

Ebner, T., Gruber, I. y Moser, M. 2004. Location of herniation predicts implantation behaviour of hatching blastocysts. *Journal of the Turkish-German Gynecological Association.* 8: 184-189.

Fisch, J.D., Rodriguez, H., Ross, R., Overby, G. y Sher, G. 2001. The Graduated Embryo Score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos. *Hum Reprod.* 16(9): 1970-1975.

Fisch, J.D., Sher, G., Adamowicz, M. y Keskintepe, L. 2003. The graduated embryo score predicts the outcome of assisted reproductive technologies better than a single day 3 evaluation and achieves results associated with blastocyst transfer from day 3 embryo transfer. *Fertil Steril.* 80(6): 1352-1358.

Fujiwara, M., Takahashi, K., Izuno, M., Duan, Y.R., Kazono, M., Kimura, F. y Noda Y. 2007.

Effect of micro-environment maintenance on embryo culture after in-vitro fertilization: comparison of top-load mini incubator and conventional front-load incubator. *J Assist Reprod Genet.* 24(1): 5-9.

Gardner, D. K. y Schoolcraft, W. B. 1998. Human Embryo Viability: What Determines Developmental Potential, and Can It Be Assessed? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 15(8)

Gardner, D.K. y Schoolcraft, W.B. 1999. In vitro culture of human blastocysts. In: Jansen R, Mortimer D (eds) *Toward reproductive certainty: fertility and genetics beyond*. Parthenon Publishing, Carnforth, UK. pp. 378-388

Gardner, D.K., Lane, M., Stevens, J., Schlenker, T. y Schoolcraft, W.B. 2000. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril.* 73(6): 1155-1158.

Gardner, D.K., Surrey, E., Minjarez, D., Leitz, A., Stevens, J., Schoolcraft, W.B. 2004. Single blastocyst transfer: a prospective randomized trial. *Fertil Steril.* 81(3): 551-555.

Gleicher, N., Kushnir, V.A. y Barad, D.H. 2015. Is it time for a paradigm shift in understanding embryo selection? *Reprod Biol Endocrinol.* (en prensa).

Goodman, C., Jeyendran, R.S. y Coulam, C.B. 2008. Vascular endothelial growth factor gene polymorphism and implantation failure. *Reprod Biomed Online.* 16(5): 720-723.

Graham, J., Han, T., Porter, R., Levy, M., Stillman, R. y Tucker, M.J. 2000. Day 3 morphology is a poor predictor of blastocyst quality in extended culture. *Fertil Steril.* 74(3): 495-497.

Guerif, F., Frapsauce, C., Chavez, C., Cadoret, V. y Royere, D. 2011. Treating women under 36 years old without top-quality embryos on day 2: a prospective study comparing double embryo transfer with single blastocyst transfer. *Hum Reprod.* 26(4): 775-781.

Hardarson, T., Bungum, M., Conaghan, J., Meintjes, M., Chantilis, S. J., Molnar, L., ... & Wikland, M. 2015. Noninferiority, randomized, controlled trial comparing

- embryo development using media developed for sequential or undisturbed culture in a time-lapse setup. *Fertility and sterility*, 104(6), 1452-1459.
- Kolibianakis, E.M. y Devroey, P. 2002. Blastocyst culture: facts and fiction. *Reprod Biomed Online*. 5(3): 285-93.
- Kováč, B., Vlasisavljević, V., Reljić, M. y Cizek-Sajko, M. 2004. Developmental capacity of different morphological types of day 5 human morulae and blastocysts. *Reproduction Biomedicine Online*. 8: 687-694.
- Lane, M., y Gardner, D.K. 2007. Embryo culture medium: which is the best? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. (1): 83-100.
- Levitas, E., Lunenfeld, E., Har-Vardi, I., Albotiano, S., Sonin, Y., Hackmon-Ram, R. y Potashnik, G. 2004. Blastocyst-stage embryo transfer in patients who failed to conceive in three or more day 2-3 embryo transfer cycles: a prospective, randomized study. *Fertil Steril*. 81(3): 567-571.
- Luna, M., Copperman, A.B., Duke, M., Ezcurra, D., Sandler, B. y Barritt, J. 2008. Human blastocyst morphological quality is significantly improved in embryos classified as fast on day 3 (≥ 10 cells), bringing into question current embryological dogma. *Fertil Steril*. 89(2): 358-363.
- Mangalraj, A.M., Muthukumar, K., Aleyamma, T., Kamath, M.S. y George, K. 2009. Blastocyst stage transfer vs cleavage stage embryo transfer. *J Hum Reprod Sci*. 2(1): 23-26.
- Marsh, C.A., Farr, S.L., Chang, J., Kissin, D.M., Grainger, D.A., Posner, S.F., Macaluso, M. y Jamieson, D.J. 2012. Trends and factors associated with the Day 5 embryo transfer, assisted reproductive technology surveillance, USA, 2001-2009. *Hum Reprod*. 27(8): 2325-2331.
- Mesut, N., Ciray, H.N., Mesut, A., Aksoy, T. y Bahceci, M. 2011. Cryopreservation of blastocysts is the most feasible strategy in good responder patients. *Fertil Steril*. 96(5): 1121-1125.
- Milki, A.A., Fisch, J.D. y Behr, B. 1999. Two-blastocyst transfer has similar pregnancy rates and a decreased multiple gestation rate compared with three-blastocyst transfer. *Fertil Steril*. 72(2): 225-228.
- Milki, A.A., Jun, S.H., Hinckley, M.D., Behr, B., Giudice, L.C. y Westphal, L.M. 2003. Incidence of monozygotic twinning with blastocyst transfer compared to cleavage-stage transfer. *Fertil Steril* 79: 503-506.
- Neuber, E., Rinaudo, P., Trimarchi, JR. y Sakkas, D. 2003. Sequential assessment of individually cultured human embryos as an indicator of subsequent good quality blastocyst development. *Hum Reprod*. 18(6): 1307-12.
- Papanikolaou, E.G., Camus, M., Kolibianakis, E., Van Landuyt, L., Van Steirteghem, A., Devroey, P., 2006. *In vitro* fertilization with single blastocyst-stage versus single cleavage-stage embryos. *N. Engl. J. Med*. 354: 1139-1146.
- Papanikolaou, E.G., D'haeseleer, E., Verheyen, G., Van de Velde, H., Camus, M., Van Steirteghem, A., Devroey, P., Tounaye, H. 2005. Live birth rate is significantly higher after blastocyst transfer than after cleavage-stage embryo transfer when at least four embryos are available on day 3 of embryo culture. A randomized prospective study. *Hum. Reprod*. 20: 3198-3203.
- Papanikolaou, E.G., Kolibianakis, E.M., Tournaye, H., Venetis, C.A., Fatemi, H., Tarlatzis, B. y Devroey P. 2008. Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 23(1): 91-99.
- Prabhleen, K, Swarankar, M.L., Manju, M. y Seema, S. 2013. Implantation Rates after Two and Five Days of Embryo Culture: A Comparative Study. *JK Science*. 15(4): 185-188.
- Racowsky, C., Jackson, K.V., Cekleniak, N.A., Fox, J.H., Hornstein, M.D. y Ginsburg, E.S. 2000. The number of eight-cell embryos is a key determinant for selecting day 3 or day 5 transfer. *Fertil Steril*. 73(3): 558-564.
- Reh, A., Fino, E., Krey, L., Berkeley, A., Noyes, N. y Grifo, J. 2010. Optimizing embryo selection with day 5 transfer. *Fertil. Steril*. 93: 609-615.
- Rehman, K.S., Bukulmez, O., Langley, M., Carr, B.R., Nackley, A.C., Doody, K.M. y Doody, K.J. 2007. Late stages of embryo progression are a much better predictor of clinical pregnancy than early cleavage in intracytoplasmic sperm injection and *in vitro* fertilization cycles with blastocyst-stage transfer. *Fertil Steril*. 87(5): 1041-1052.
- Rienzi, L., Vajta, G. y Ubaldi, F. 2010. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. *Hum Reprod Update*. 17(1): 34-45
- Rijnders, P.M., van Os, H.C. y Jansen, C.A.M. 1998. Increased incidence of monozygotic twinning following the transfer of blastocyst in human IVF/ICSI. *Fertil Steril* 70: (Suppl 1),S15.
- Rijnders, P.M. y Jansen, C.A. 1998. The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following *in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 13: 2869-2873.
- Santos, M.J., Mercader, A., Galan, A., Albert, C., Romero, J.L. y Pellicer, A. 2003. Implantation rates after two, three, or five days of embryo culture. *Placenta*. 24: S13-S19.
- Schoolcraft, W.B. y Gardner, D.K. 2000. Blastocyst culture and transfer increases the efficiency of oocyte donation. *Fertil Steril*. 74: 482-486.
- Scott L. 2003. The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. *Hum. Reprod. Update*. (9): 237-249.
- Sengupta, J. y Ghosh, D. 2014. Multi-level and multi-scale integrative approach to the understanding of human blastocyst implantation. *Prog Biophys Mol Biol*. 114(1): 49-60.
- Shapiro, B.S., Daneshmand, S.T., Garner, F.C., Aguirre, M., Hudson, C. y Thomas, S. 2011. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for *in vitro* fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders. *Fertil Steril*. 96(2): 344-348.
- Sharara, F.I. y Abdo, G. 2010. Incidence of monozygotic twins in blastocyst and cleavage stage assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril*. 93(2): 642-645.

Smeenk, J.M.J., Verhaak, C.M., Eugster A., Minnen A. V., Zielhuis G.A. y Braat D.D.M. 2001. The effect of anxiety and depression on the outcome of in-vitro fertilization. *Human Reproduction* 16(7): 1420–1423.

Smith, L.P., Oskowitz, S.P., Dodge, L.E. y Hacker, M.R. 2013. Risk of ectopic pregnancy following day-5 embryo transfer compared with day-3 transfer. *Reprod Biomed Online*. 27(4): 407-413.

Staessen, C., Platteau, P., Van Assche, E., Michiels, A., Tournaye, H., Camus, M., Devroey, P., Liebaers, I. y Van Steirteghem, A. 2004. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum. Reprod.* 19: 2849 –2858.

Tarlatzis, B.C., Qublan, H.S., Sanopoulou, T., Zepiridis, L., Grimbizis, G. y Bontis, J. 2002. Increase in the monozygotic twinning rate after intracytoplasmic sperm injection and blastocyst stage embryo transfer. *Fertil Steril.* 77:196–198.

Thomas, M.R., Sparks, A.E., Ryan, G.L. y Van-Voorhis, B.J. 2010. Clinical predictors of human blastocyst formation and pregnancy

after extended embryo culture and transfer. *Fertil Steril.* 94(2): 543–458.

Thurin, A., Hausken, J., Hillensjö, T., Jablonowska, B., Pinborg, A., Strandell, A. y Bergh, C. 2004. Elective single-embryo transfer versus double-embryo transfer in *in vitro* fertilization. *N. Engl. J. Med.* 351(23): 2392-2402.

VerMilyea, M. D., Graham, J. R., Anthony, J. T., Ignaszewski, A. D., & Tucker, M. J. (En prensa) Continuous Single Culture™ Comparison of Clinical Outcomes using a Single-Step Uninterrupted Culture Medium Protocol Requiring No Medium Renewal vs. a Traditional Three-Step Sequential Medium System.

Yoon, H.G., Yoon, S.H., Son, W.Y., Kim, J.G., Im, K.S. y Lim, J.H. 2001. Alternative embryo transfer on day 3 or day 5 for reducing the risk of multiple gestations. *J Assist Reprod Genet.* 18(5): 262-267.

Zech, N.H., Lejeune, B., Puissant, F., Vanderzwalmen, S., Zech, H. y Vanderzwalmen, P. 2007. Prospective evaluation of the optimal time for selecting a single embryo for transfer: day 3 versus day 5. *Fertil Steril.* 88(1): 244-246.

Páginas web consultadas ordenadas según se citan en el texto:

¹http://www.sart.org/Society_for_Assisted_Reproductive_Technology_Releases_New_Annual_Report_on_In_Vitro_Fertilization_Procedures/

²<http://asebir.com/cuadernos-asebir/criterios-asebir-de-valoracion-morfologica-de-oocitos-embriones-tempranos-y-blastocistos-humanos/>

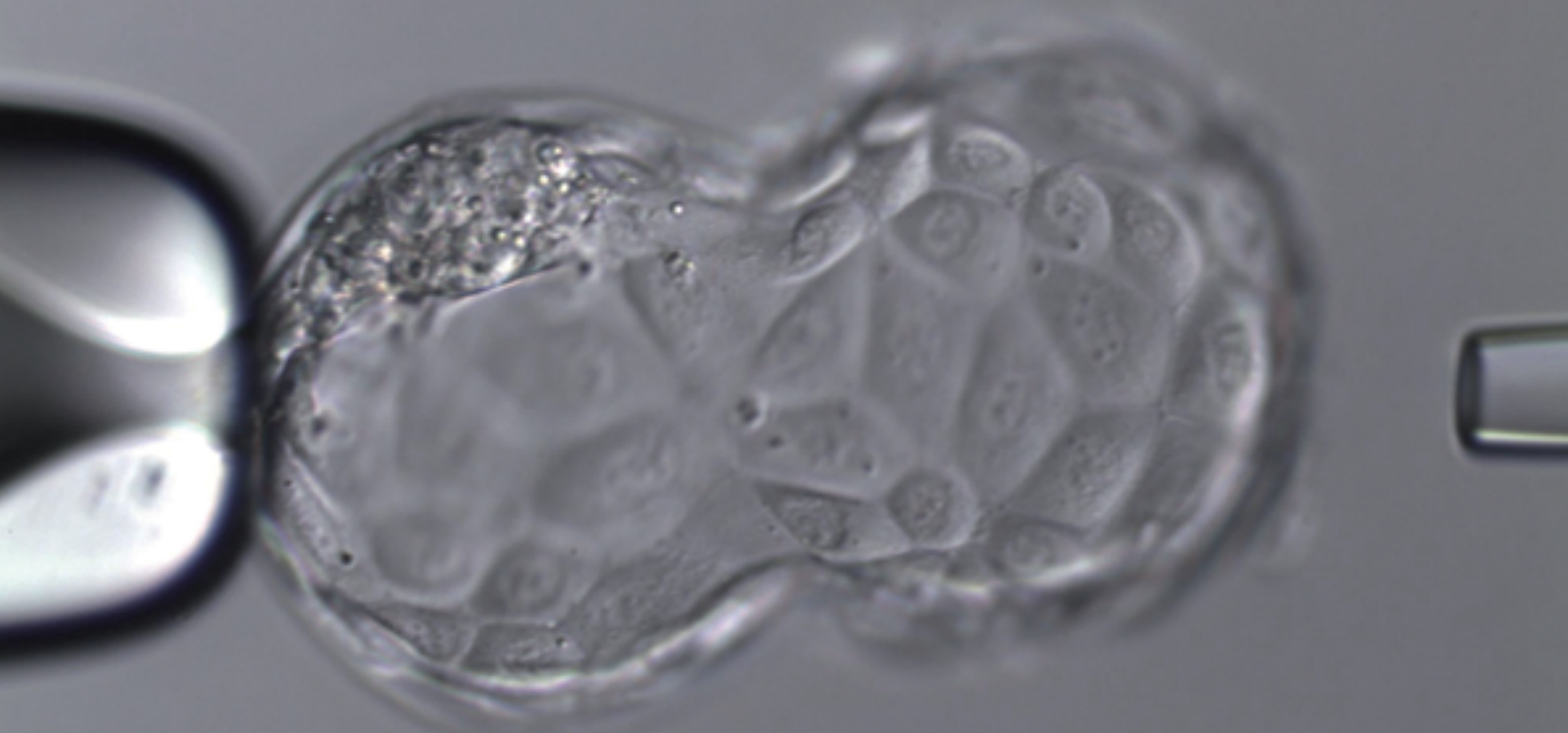
Páginas webs consultadas ordenadas según se citan en las figuras y tablas:

<http://www.quimicaviva.gb.fcen.uba.ar/v7n2/Fontana/Figura%2042%20copy.jpg>

Estas páginas webs se consultaron en varias ocasiones a lo largo de la realización del trabajo.

OLYMPUS

Your Vision, Our Future



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](http://embryotools.com)

XXV EDICIÓN DE LA AYUDA MERCK SERONO DE INVESTIGACIÓN 2016



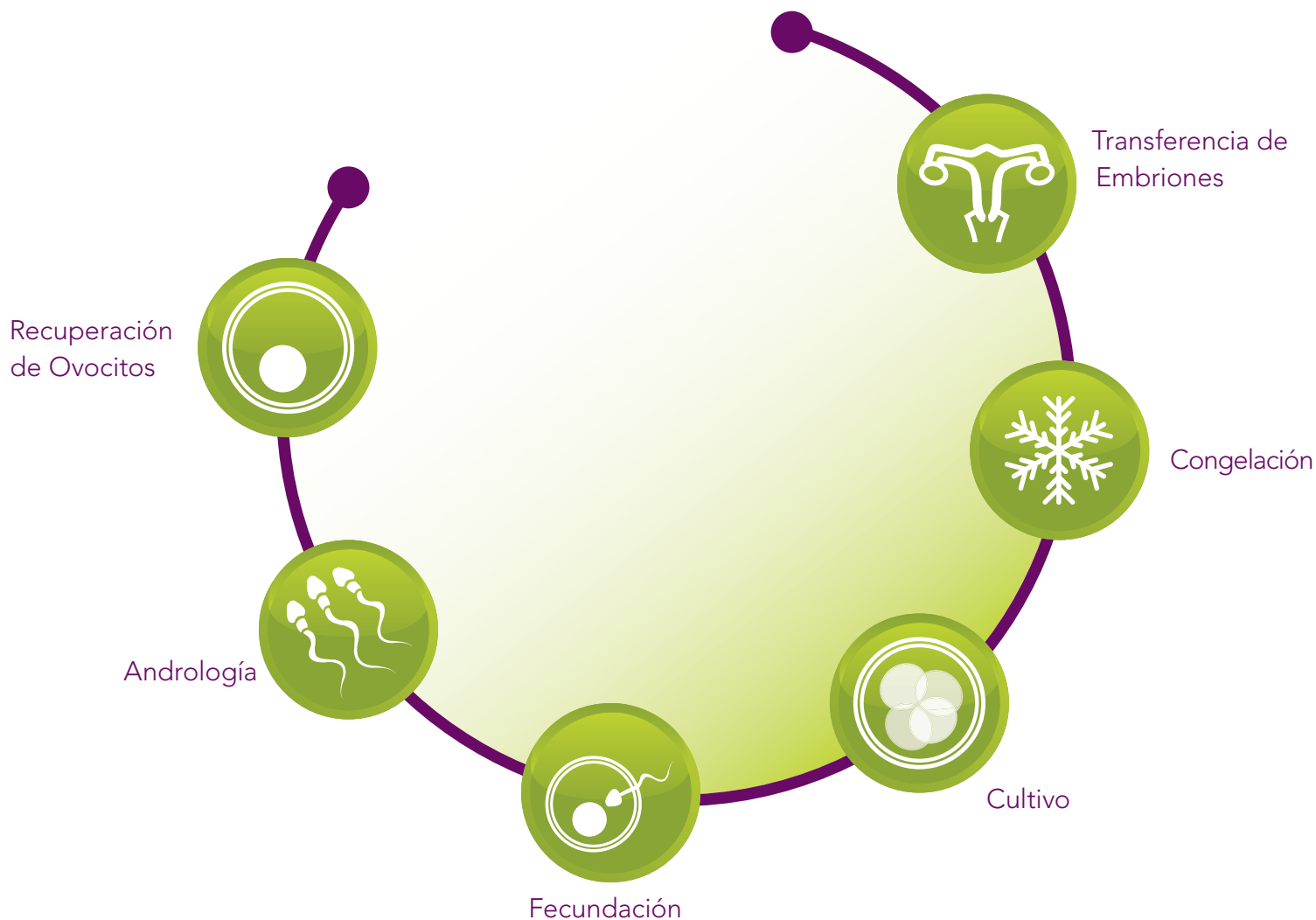
El 9 de abril tuvo lugar en Madrid la reunión anual donde se fallaron los premios de la Ayuda Merck Serono de Investigación en Fertilidad. Entre los miembros del jurado de esta convocatoria se encontraban el Dr. Agustín Ballesteros, el Dr. Antonio Requena, el Dr. Francisco J. de Castro Pita, el Dr. Koldo Carbonero, la

Dra. Montserrat Boada, el Dr. Pedro Barri Rague y el Dr. Roque Devesa. Las ayudas Merck de Investigación celebran este año además su 25 Aniversario.

Los premios se entregarán el 6 de julio en el Acto conmemorativo del 25 aniversario y de Entrega de las Ayudas

Merck de Investigación junto a 7 ayudas más en otras áreas de investigación (Cáncer Colorectal, Cáncer de Pulmón, Cáncer de Cabeza y Cuello, Enfermedades Raras, Esclerosis Múltiple, Alergología y Endocrinología Pediátrica).

ORIGIO- Su proveedor de soluciones para FIV



ORIGIO es, desde 1987, líder mundial en proveer soluciones para todo tipo de Técnicas de Reproducción Asistida. Mediante la investigación y la innovación, ORIGIO tiene como objetivo ofrecer productos y servicios a profesionales de la Reproducción Asistida en cada paso del proceso de la Fecundación In Vitro. Junto con nuestros clientes ayudamos a hacer realidad el sueño de muchas parejas en más de 100 países.

ORIGIO pertenece al grupo CooperSurgical. Lea más en www.origio.com.



origio

a CooperSurgical Company

Origio Medicult Espana S.L

C/ Platón 6 • 08021 Barcelona • España

Tel: 93 199 81 18 or 93 199 81 19 • Fax: 93 362 36 11

E-mail: barcelona@origio.com • www.origio.com

EXPERIENCIAS VIVIDAS EN EL CONGRESO DE SAN SEBASTIÁN

Queridos compañeros, tras la finalización del VIII congreso de Asebir en mi querida tierra donostiarra quisiera compartir con vosotros las experiencias vividas y un resumen de lo acontecido en los tres días de duración del mismo.

Antes de nada agradecer a todo el mundo que asistió la interacción con la ciudad y con cada momento acontecido durante el congreso. Gracias por asistir, gracias por participar en cada acto y sobre todo gracias por dar a ASEBIR la importancia que tiene. Queda demostrado en cada edición el valor añadido que tenemos los embriólogos, la pasión que ponemos en nuestro trabajo y sobre todo el futuro que tiene el congreso y la asociación como referente en nuestra sociedad.

No quiero olvidar el gran apoyo que ha significado para mí la secretaría técnica del Grupo Process (Miguel, Carmen, Josu) y en especial a M^a José Prieto. NO hay palabras para agradecer la suerte que tenemos de tener a alguien como M^a José dentro de nuestra asociación. Pasión, constancia y el trabajo bien hecho hace que sea una tónica de cada día y dé valor a nuestra asociación.

Tras la vuelta del congreso de Sevilla comenzaba la andadura para poder, por lo menos, igualar el buen trabajo realizado por Antonio Luis González Utor.



No había duda que la sede debía realizarse en el palacio de Congresos del Kursaal, que iluminado de noche parece ser un sol rectangular que ha rodado por la arena de la playa, un lugar emblemático para nuestro congreso.

NO solo la sede, la elección del logo debía ser una representación de lo que significaba para mí mi ciudad y de lo que os quería transmitir. Fue fácil elegirlo por el significado que Chillida y la playa de la Concha significan en San Sebastián.





Parecía mentira como pasaba el tiempo de rápido mientras se organizaba y realizábamos las reuniones correspondientes para tener un buen nivel científico y social. Gracias al comité científico por la labor realizada en estos dos años y por apoyar las nuevas ideas que se presentaban.



Llegó el primer día de inauguración institucional con la presencia de autoridades por parte del Gobierno de Gipuzkoa, Denis Itxaso, Universidad del País Vasco, Profesor Luis Casis, y con nuestra presidenta Montse Boada a la cual quiero agradecer su esfuerzo y colaboración durante todo el proceso.

Tras declarar inaugurado el congreso comenzó el formato científico mantenido por la Junta Directiva. La primera sesión científica inaugural correspondía al grupo de interés de Andrología quién abrió las jornadas científicas con un alto interés de debate como así lo mostraron posteriormente las encuestas realizadas. Cabe también mencionar el primer symposium satélite

de COOK que puso un broche más a la tarde científica del primer día.

Fue una tarde provechosa que concluyó con el acto inaugural del congreso mediante un cocktail de bienvenida y un baile en honor a todo vosotros queriendo representar el cariño y la satisfacción tan grande que tenía San Sebastián de poder acogeros a todos vosotros con un grupo que para mí representa la cultura y la elegancia como fue el grupo KUKAI.

La mañana del jueves comenzó temprano con el Grupo de Interés de Embriología donde tuvimos la suerte de contar con la presencia de dos ponentes internacionales Laura Rienzi y Aisling Ahlstrom. Entre sesiones y para reponer fuerzas, realizamos pausas para tomar café, zumos, comida, queriendo mostrar en todo momento nuestra gastronomía.

Por la tarde se abrió la sesión científica con la primera participación del grupo de interés de Criobiología recién creado y al que auguro un gran éxito debido al interés científico que despiertan los temas que puede abarcar.

Finalizada la jornada científica incluyendo los Symposium Satélite de EMB y Merck mis nervios se centraban en lo que era la primera vez que se organizaba una carrera solidaria de 5km, con la intención de ayudar a **JUNEREN HEGOAK** (Las Alas de June), Asociación sin ánimo de lucro, cuyo objetivo es generar una red de apoyo para familias que están viviendo la dura experiencia de la enfermedad, muerte o duelo de sus hijos y/o hijas. "Nuestro

compromiso con la sociedad debe ser no sólo científico, sino también solidario".

Debo resaltar la complicidad de todos vosotros con esta asociación y con la ciudad. Fue algo emocionante que sin duda nunca podré olvidar, de nuevo GRACIAS.

Nuestro final de día culminó con una cena donde todos pudimos compartir el buen sabor de la comida y todas nuestras vivencias científicas. Se entregó el premio Crio –Merck a la mejor comunicación oral inaugurando la primera edición de este premio.

Me quedo con la gran interacción entre todos nosotros que hace que aunque no nos podamos ver muy a menudo podamos compartir estos momentos.

El viernes le tocó el turno al grupo de interés de Genética y Calidad donde pudo comprobarse de nuevo los avances y lo que nos queda todavía por aprender, compartir y sobre todo desarrollar. Se



entregaron dentro de la Asamblea de socios, los primeros galardones a las primeras clínicas que han instaurado la nueva norma de calidad. De igual forma Origio inauguró su primer symposium científico.

El remate científico de la tarde fue la ponencia de clausura teniendo como invitado especial al Dr. Gianaroli.

Tras los tres días de trabajo científico el colofón de estas jornadas fue la cena de clausura en el Hotel M^a Cristina donde pudimos poner el broche de oro con la entrega de los premios ASEBIR-EMB 2015, una cena amenizada en el festival internacional de San Sebastián y un dj que alargó la velada hasta altas horas de la noche.

Tras todos estos días de actividad y tras dos años de intenso trabajo todo



había finalizado. Quedo con una buena sensación y satisfecho del desarrollo del mismo. De ver palabras que para mí son importantes: compartir, relacionarse, debatir y sobre todo ver cómo nos apasiona nuestro trabajo.

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las casas comerciales, junta directiva en especial al comité científico por su apoyo pero sobre todo a VOSOTROS socios de ASEBIR. Sin vuestra contribución con los 193 trabajos presentados, y con vuestra participación, 422 inscritos, esto no hubiera sido posible.





Gracias desde la Bella Easo, espero que os hayais sentido como en casa.

Yosu Franco

PROXIMO CONGRESO MADRID 2017

Estimados compañeros/as,

Me dirijo a vosotros en nombre de todos los profesionales de la Reproducción Asistida de Madrid.

Es para todos nosotros un motivo de enorme alegría y satisfacción aprovechar esta oportunidad que la revista ASEBIR nos brinda, para invitaros formalmente al IX Congreso ASEBIR que celebraremos del 15 al 17 de noviembre de 2017 en Madrid. Nuestra ciudad y desde ahora la de todos vosotros!!!

El proyecto arranca con muchísima ilusión compartida por todos los miembros del Comité Científico y Organizador.

Madrid es una ciudad cosmopolita, cálida y acogedora, con una vida cultural muy rica y activa. Estamos seguros que disfrutareis mucho durante vuestra estancia con nosotros.

Por último, queremos expresar nuestro agradecimiento y afecto a los miembros de nuestra Junta Directiva por su apoyo en el desarrollo de este proyecto.

Estamos deseando ser vuestros anfitriones.

¡Os esperamos en Madrid!
Dra. Yolanda Mínguez Royo

Presidenta Comité Científico
y Organizador

IX Congreso ASEBIR



PREMIO AL MEJOR PÓSTER BÁSICO SEF 2016



La comunicación enviada desde el Grupo de Interés de Calidad al congreso de la SEF, celebrado en Málaga del 19 al 21 de mayo de este año, ha ganado el premio al mejor Póster Básico.

Título: Comparación de fungibles a evaluar en el programa ASEBIR de control de calidad externo de citotoxicidad (CCE-CT) para el laboratorio de embriología.

Autor/es: Luis Martínez Granados, Sandra Zamora López, Antonio

González Utor, Nereyda Ortiz Piñate, María Serrano Molina, Vicente Badajoz Liebana, Irene Molina González, José Antonio Castilla Alcalá

Según palabras de la presidenta de dicho Grupo de Interés, la Dra. Nereyda Ortiz, "...esto nos anima a seguir trabajando cada vez con mayor fuerza en el crecimiento de nuestro Grupo y por ende de la Sociedad a la que representamos".

Enhorabuena a los ganadores!



ASEBIR EN LA SEF 2016

Con motivo del Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad celebrada en Málaga del 19 al 21 de mayo, Asebir ha recibido en el Stand numerosas visitas de los congresistas y se han entregado ejemplares de los

últimos cuadernos de ASEBIR y las tablas de la nueva Clasificación Embrionaria.

Este año, se ha realizado en nuestro Stand un concurso con el formato del conocido programa Pasapalabra. Los

ganadores han sido 3 socios de Asebir, Yolanda Galiana, Alba Burguera Girau y Luis Delgado Cigüela.

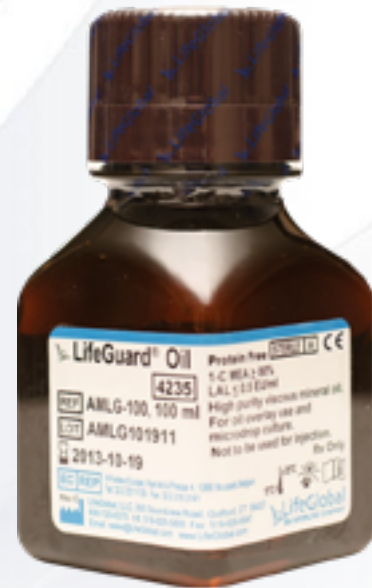
Los premios fueron entregados por EMB.





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

CURSOS PRESENCIALES

IV Practicum ASEBIR de Micromanipulación (ICSI y Assisted Hatching)

Fecha: 12-13 de mayo de 2016

Sede: Aula EMB-ASEBIR de Cáceres

Secretaria: CCMI, Cáceres

Email: nhernandez@ccmijesususon.com

<http://asebir.com/agenda/curso-asebir-v-practicum-de-micromanipulacion-icsi-y-assisted-hatching/>

Curso organizado por el Grupo de Interés de Embriología de ASEBIR

Curso Práctico de Microscopía confocal y electrónica para el estudio del espermatozoide Humano.

Fecha: 19 y 20 de septiembre 2016.

Sede: Universidad de Alicante.

Secretaria técnica: Universidad de Alicante.

Curso en Co-Dirección Universidad de Alicante y ASEBIR. Organizado por el Grupo de Interés de Andrología de ASEBIR

Curso Genética y Asesoramiento Genético en Reproducción Asistida

Fecha: Septiembre

Sede: Valencia

Secretaria técnica: ASEBIR

Email: asebir@asebir.com

Curso organizado por el Grupo de Interés de Genética de ASEBIR

III Practicum de Vitrificación de ovocitos y embriones

Fecha: 20-21 Octubre 2016

Sede: Aula EMB-ASEBIR de Cáceres

Secretaria: CCMI, Cáceres

Curso organizado por el Grupo de Interés de Criobiología de ASEBIR

II Practicum ASEBIR de Biopsiado y Aislamiento de Blastómeros

Fecha: Noviembre 2016

Sede: Aula EMB-ASEBIR de Cáceres

Secretaria: CCMI, Cáceres

Curso organizado por el Grupo de Interés de Genética de ASEBIR

I TALLER DE CLASIFICACIÓN EMBRIONARIA CLÁSICA VS TIME LAPSE

Fecha: 15 Noviembre 2016

Sede: Hospital General Universitario de Valencia.

Secretaria técnica: ASEBIR

Email: asebir@asebir.com

Curso organizado por el Grupo de Interés de Embriología de ASEBIR

CURSOS ONLINE

Curso on-line: 2ª Edición Actualización de la Catalogación Embrionaria ASEBIR

Fechas: 6-26 Junio 2016

Sede: On line

Secretaría técnica: ASEBIR

Email: asebir@asebir.com

<http://http://asebir.com/agenda/curso-asebir-actualizacion-de-la-catalogacion-embrionaria-asebir-2a-edicion/>

Curso organizado por el Grupo de Interés de Embriología de ASEBIR

Curso on-line: 3ª Edición Aplicaciones de la Genética en Reproducción Asistida

Fechas: Octubre-Enero 2016

Sede: On line

Secretaría técnica: ASEBIR

Email: asebir@asebir.com

Curso organizado por el Grupo de Interés de Genética de ASEBIR

AGENDA DE CONGRESOS

ESHRE 2016

Dates: July 03-06 2016

Place: Helsinki, Finland

For more information: <https://www.eshre2016.eu/>

ASRM 2016

Description: 72nd ASRM Scientific Congress & Expo

Dates: October 15-19, 2016

Place: Salt Lake City, UT, USA

For More Information: ASRM, Tel: 205-978-5000, Fax: 205-978-5018, Email: asrm@asrm.org

17th World Congress on Human Reproduction

Dates: March 15-18 2017

Place: Rome, Italy

For more information: <http://hr2017.humanreproducademy.org/>

IX Congreso ASEBIR Madrid 2017

Fechas: 15-17 de noviembre de 2017

Sede: Centro de Convenciones Hotel Meliá Castilla, Madrid

Secretaría técnica: Grupo Process S.L. - E-mail: info@congresoasebir.es - Teléfono: 91 377 14 23

REVISTA DE EMBRIOLOGÍA CLÍNICA Y BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

www.asebir.com

ASEBIR

UNA APUESTA POR LA CALIDAD