

REVISTA

ASEBIR



PROGRAMA CIENTÍFICO

GRUPO DE INTERES ASEBIR

SESIÓN EMBRIOLOGÍA SESIÓN ANDROLOGÍA

SESIÓN GENÉTICA Y REPRODUCCIÓN

AULA VIRTUAL

DEBATE

EVOLUCIÓN PREMIOS ASEBIR EMB 2007

COMUNICACIONES ORALES

COMUNICACIONES POSTER

AGRADECIMIENTOS

CONGRESO ACREDITADO POR LA COMISIÓN
DE FORMACIÓN CONTINUADA DE LA COMUNIDAD
VALENCIANA CON 2,5 CRÉDITOS



CON LA COLABORACIÓN DEL VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN Y POLÍTICA CIENTÍFICA
DE LA UNIVERSITAT DE VALÈNCIA.



IrvineScientific: VIT-KIT FREEZE / VIT-KIT THAW

Un mismo kit para la VITRIFICACIÓN de oocitos, embriones y blastocitos

PROCESO DE VITRIFICACION:



Solución de Equilibrio

Solución de Vitrificación

Embriones desvitrificados: división en día +4

PACIENTE 1



D+3

D+4

PACIENTE 2



D+3

D+4

** Imágenes cedidas por CREA (Valencia)



PROCESO	MEDIOS	MEDIOS CON PROTEÍNA	CRIOPRESERVACIÓN
Recuperación de oocitos	mHTF		Vit-kit Freeze / Vit-kit Thaw
Preparación de semen	mHTF	Sperm Washing Medium Isolate	Freezing M.-Test Yolk Buffer Refrigeration M.-Test Yolk Buffer
Preincubación de gametos	HTF P-1 / ECM	- Complete P-1 / Complete ECM	
Fertilización, y cultivo D1-D3	HTF P-1 / ECM SSM	- Complete P-1 / Complete ECM -	Vit-kit Freeze / Vit-kit Thaw Embryo Freeze / Embryo thaw
Cultivo D3-D6	MBM SSM	Complete MBM -	Vit-kit Freeze / Vit-kit Thaw Blastocyst Freeze / Blastocyst Thaw
ICSI	mHTF	PVP	
PGD	Tyrodé's	Embryo Biopsy Medium	

SSM: SINGLE STEP MEDIUM

IZASA, S.A.
C/ Aragó 90
Barcelona 080015

Consultas: irvine@izasa.es
DAC: 902.20.30.70

ASEBIR

SUMARIO

SUMARIO	Pág.
EDITORIAL Mark Grossmann i Camps y M ^a José de los Santos Molina.	3
PROGRAMA CIENTÍFICO CONGRESO ASEBIR	4
GRUPO DE INTERES ASEBIR Estado Actual del Grupo de Interés de Calidad Embrionaria. Jorge Cuadros Indicadores Laboratorio de Embriología Clínica Juan Manuel Moreno Estado Actual del Grupo de Interés de DGP Esther Fernández Registro de la Sociedad Española de Fertilidad de Técnicas de Reproducción asistida Jose A. Castilla	8
SESIÓN EMBRIOLOGÍA Requisitos del laboratorio de embriología clínica M. Cristina Magli, Luca Gianaroli, Anna P. Ferraretti Manejo de pacientes con enfermedades infecciosas en el laboratorio de Reproducción Asistida. ¿Representa realmente un riesgo en el laboratorio? Fernando Marina, Ruth Alcolea y Simón Marina Oocyte and Embryo Oxygen Consumption Can it tell us anything about developmental potential? Lynette Scott, PhD,	22
SESIÓN ANDROLOGÍA Integridad del ADN y patrón de expresión génica Marcos Meseguer, Sandra García-Herrero, Cristobal Aguilar, Thamara Viloria, Nicolás Garrido Impacto del Grado de Fragmentación del ADN en los resultados en FIV convencional e ICSI Jorge Ten, Joaquín Llácer, Belén Lledó, Adoración Rodríguez, Ruth Morales, Rafael Bernabeu	33
SESIÓN GENÉTICA Y REPRODUCCIÓN Uso de Microarrays en Diagnóstico Genético Preimplantacional Carles Giménez ¿Qué nos aporta el estudio de FISH en espermatozoides en el estudio de la pareja infértil? Joan Blanco, Zaida Sarrate, Ester Anton, Lydia Garcia-Quevedo, Òscar Molina, Francesca Vidal Infertilidad y Genética: Producción de Gametos a partir de Células Madre Embrionarias. Ana Isabel Marqués Marí, Carlos Simón	47
AULA VIRTUAL La microscopía de luz polarizada: aplicaciones clínicas en las técnicas de reproducción asistida Gemma Arroyo	63
DEBATE Mitos y Leyendas en el laboratorio de Embriología Clínica: Efecto perjudicial de la luz del laboratorio sobre los embriones humanos A FAVOR - Emilio Gómez Sánchez e Inmaculada Torres González EN CONTRA - Antonio Urries, Carolina Roméu, Montse Lierta, Cristina Calzada	68
EVOLUCIÓN PREMIOS ASEBIR EMB 2007 Incidencia de anomalías epigenéticas de los loci H19 y SNRPN en espermatozoides de individuos que consultan por problemas de fertilidad Marta Pladevall, Cristina Camprubí, Joan Blanco Vitrificación y hatching asistido Empar Ferrer, Minerva Ferrer, Carmen Calatayud, Miguel Ruiz Jorro y Maria Vila.	72
COMUNICACIONES ORALES	89
COMUNICACIONES POSTER	118
AGRADECIMIENTOS	228

Diciembre 2009 Vol. 14 • N^o2

EDITA

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

JUNTA DIRECTIVA

Presidente: Mark Grossmann i Camps.

Vicepresidenta: M^a Victoria Hurtado de Mendoza.

Secretaría: Nieves Cremades Fernández

Tesorero: Manuel Ardoy Vilches

Vocalía de Docencia y Formación: Jorge

Martín Cuadros Fernández, Montserrat Boada Palá.

Vocalía del Sitio Web: Jorge Ten Morro, Fernando Marina Rugero.

Vocalía de Publicaciones: María Bonada Sanjaume, Antonio Urries López.

Vocalía de Congresos: M^a José de los Santos Molina, Begoña Arán Corbella, Nieves Cremades Fernández.

Vocalía de Relaciones Públicas: Fernando Marina Rugero, Jorge Ten Morro.

COORDINACIÓN

María Bonada Sanjaume, Antonio Urries López.

PUBLICIDAD Y COLABORACIONES

Secretaría ASEBIR

C/ Cronos 20, Edificio 4, 1^o, 6^a

28037 Madrid - Tfno: 91 367 89 94

www.asebir.com · asebir@asebir.com

DISEÑO, MAQUETACIÓN E IMPRESIÓN

GÓBALO

Gráfica · Web · Multimedia · Consultoría

C/ Nogal 1, 1^o Pta.31

28250 - Torrelozanes · Madrid

Tfno - Fax.: 91 859 57 22

www.gobalo.es · info@gobalo.es

Depósito legal: M-18873-1996

ISSN: 1136-4424

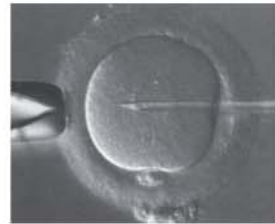
Soporte válido: 78-R-CM

CONTROLTECNICA

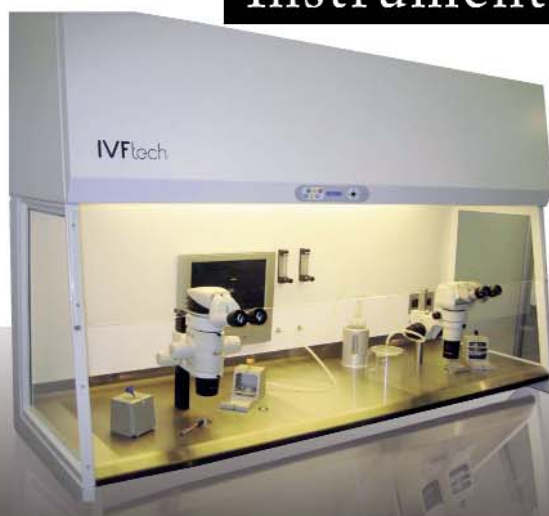
instruments

www.controltecnica.com

Incubadores CO2, Cabinas de flujo laminar, Centrífugas, Autoclaves, Balanzas, Agitadores, ... Mobiliario técnico de laboratorio



Instrumentación para ciencias de la vida



Controltecnica Instrumentación Científica S.L
C/ Artesanos, 7 (Prado del espino) 28660 Boadilla
Tel. 91 728 08 10 **Distribuidores a nivel Nacional**
E-mail: lab@controltecnica.com

CONTROLTECNICA
instruments

CONTROLTECNICA

QUERIDOS COMPAÑEROS Y COMPAÑERAS DE ASEBIR

Tenéis en vuestras manos el libro de comunicaciones de nuestro V Congreso ¡Todo un orgullo llegar a este número! Y gran satisfacción observar que nuestra sociedad sigue creciendo y consolidándose como podéis apreciar por la respuesta: muchas inscripciones que esperamos se conviertan en un alto grado de participación, más comunicaciones enviadas que en las ediciones anteriores y trabajos de gran interés.

A pesar de la crisis económica, nuestras mentes y espíritu emprendedor en el área clínica y básica no se han visto en absoluto afectados ¡Enhorabuena!

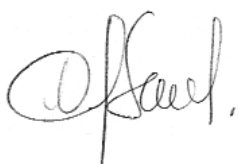
Esperamos que encontréis muy interesantes las ponencias, los trabajos seleccionadas, así como los temas elegidos para los Simposiums Satélites. Los comités organizador y científico han participado considerablemente para conseguirlo, sin olvidar la inestimable ayuda de la secretaría de nuestra sociedad. En la línea de la edición anterior en Bilbao, la comisión de Formación Continuada de la Comunidad Valenciana nos reconoce con 2,5 créditos el interés formativo del Congreso, otro paso más que puede ayudarnos a conseguir nuestra identidad en el área de la Biología de la Reproducción.

Una vez más, queremos hacer extensivo nuestro agradecimiento a nuestros colaboradores de la industria que han contribuido enormemente a que el V Congreso de ASEBIR sea una realidad. El éxito del Congreso dependerá de todos nosotros, claro, pero también del soporte continuo que recibimos de ellos, nuestros proveedores.

El Congreso de Valencia será el primero en el que se elija una Junta Directiva por el sistema de listas cerradas. En su día propusimos esta modificación para tener equipos directivos compactos capaces de afrontar nuevos hitos y para que ASEBIR siga creciendo y obtenga el máximo reconocimiento, tanto en la investigación básica como en la embriología clínica, en todos los niveles de la Administración. Elegir una nueva Junta Directiva significa también el cese de las anteriores, y en concreto en esta ocasión, Begoña Aran, Nieves Cremades y M. Victoria Hurtado de Mendoza finalizan sus responsabilidades después de nueve años de dedicación, que son muchos, con muchas energías consumidas y muchos proyectos realizados. Aunque seguro que ellas que no se desvincularán de ASEBIR, sabemos que en Valencia estarán muy tristes y esperamos que las miméis mucho.

Finalmente, deseamos que disfrutéis de vuestra estancia en Valencia y os extendemos una calurosa bienvenida al mismo tiempo que enviamos un afectuoso recuerdo a los que, por permitir que otros compañeros asistan al evento y así no desatender a los pacientes, no podáis estar con nosotros.

¡Un abrazo! ¡Nos vemos en Valencia!
Atentamente,



Dra. Mª José de los Santos
Presidenta del Comité Organizador



Mark Grossmann i Camps
Presidente de ASEBIR



- Congreso acreditado por la Comisión de Formación Continuada de la Comunidad Valenciana con 2,5 créditos
- Con la colaboración del Vicerrectorado de Investigación y Política Científica de la Universitat de València.
- Congreso auspiciado por la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (S.E.G.O.)

PATROCINADOR PLATINO



OTROS PATROCINADORES



COMITÉ DE HONOR:

- EXCMA. SRA. DÑA. TRINIDAD JIMÉNEZ GARCÍA-HERRERA. Ministra de Sanidad y Política Social del Gobierno de España
- HONORABLE SR. MANUEL CERVERA TAULET. Conseller de Sanitat de la Generalitat Valenciana
- PROFESOR D. ESTEBAN MORCILLO SÁNCHEZ . Vicerrector de Investigación y Política Científica de la Universitat de València

COMITÉ ORGANIZADOR

PRESIDENTA

- Dra. M^a José de los Santos

VOCALES

- Dra. Carmela Albert
- Dra. Pilar Buendía
- Dra. Juana Crespo
- Dr. José M^a de los Santos
- Dra. Arancha Delgado
- Dra. Blanca Gadea
- Dra. Arancha Galán

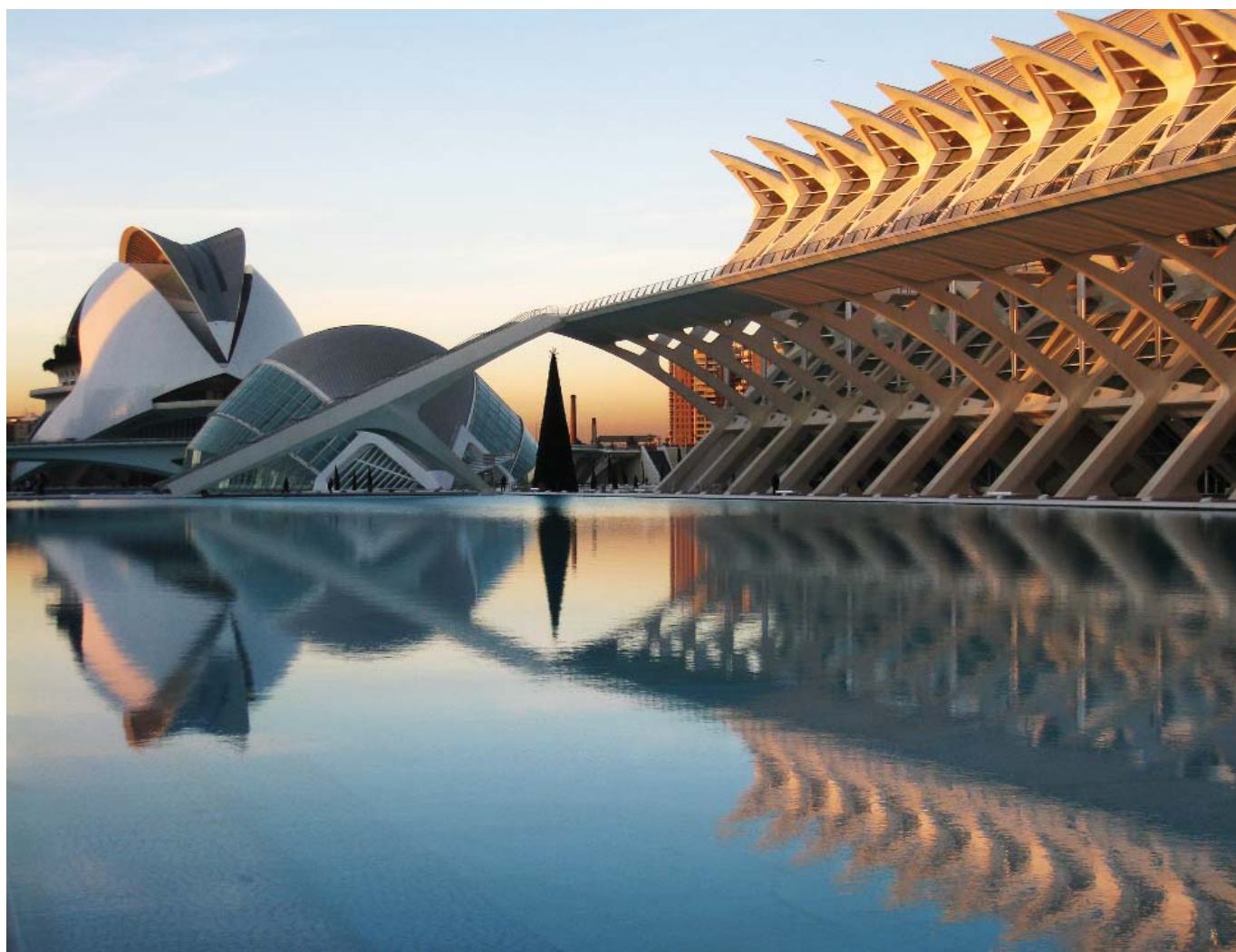
- Dra. Pilar Gámiz
- Dra. Noelia Grau
- Dra. Emilia Mateu
- Dra. Amparo Mercader
- Dra. Amparo Mifsud
- Dr. Miguel Milán
- Dr. Antonio Pellicer
- Dra. Amparo Ruiz
- Dr. Alberto Tejera
- Dra. Tamara Viloría
- Dr. Jesús Zulategui

COMITÉ CIENTÍFICO

- Dra. Begoña Arán
- Dra. Montserrat Boada
- Dra. Ana Cobo
- Dra. Nieves Cremades
- Dr. Jorge Martín Cuadros
- Dra. M^a José Escribá
- Dr. Nicolás Garrido
- Dr. Julio Martín
- Dr. Marcos Meseguer
- Dra. Inmaculada Molina
- Dr. Joaquín Moreno
- Dra. Sonia Pérez
- Dra. Lorena Rodrigo
- Dr. Josep Lluís Romero
- Dra. Carmen Rubio
- Dra. María Vila

SECRETARÍA TÉCNICA

Grupo Process, Betaprocess, S.L.
 C/ Cronos, 20, Bloque 4, 1º, 6ª - Madrid 28037 · Telf.: +34 91 377 14 23
 Fax: +34 91 377 49 65
 E-mail: Vcongreso@asebir.com



MIÉRCOLES, 25 DE NOVIEMBRE - TARDE

15:00 - 20:00 hrs. Apertura de secretaría y colocación de Pósters I.

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

17:00 - 19:30 hrs. Grupos de Interés ASEBIR. Moderadora: M^a José Figueroa (Cádiz) - Inmaculada Molina (Valencia).

*17:00 - 17:30 hrs. Estado actual del Grupo de Interés de Calidad Embrionaria. Actualización de la clasificación de ASEBIR.
Ponente: Dr. Jorge Martín Cuadros (Clínica FIV, Madrid)*

*17:30 - 18:00 hrs. Creación del tercer Cuaderno de Embriología "Afianzamiento de calidad: aspectos técnicos y aspectos biológicos".
Ponente: Dr. Manuel Ardoy (H. Univ. Gregorio Marañón, Madrid)*

18:00 - 18:30 hrs. Indicadores Laboratorio de Embriología Clínica. Ponente: Dr. Juan Manuel Moreno (Clínica Vistahermosa, Alicante)

18:30 - 19:00 hrs. Estado actual de Grupo de Interés de DGP. Ponente: Dra. Esther Fernández (GENIALITY, Madrid)

19:00 - 19:30 hrs. Registros SEF. Ponente: Dr. José Antonio Castilla (H. U. Virgen de las Nieves, Granada)

20:30 hrs. Cocktail Inaugural en el Palacio de Congresos.

JUEVES, 26 DE NOVIEMBRE - MAÑANA

08:00 - 14:00 hrs. Apertura de secretaría y colocación de Pósters II.

09:00 hrs. Apertura mesa electoral ASEBIR.

09:00 - 11:00 hrs. Sesión Embriología. Moderadores: Amparo Ruiz (Valencia) - María Bonada (Londres).

09:00 - 09:40 hrs. Ponencia I: Requisitos del laboratorio de embriología clínica: Implicaciones de la transposición de las Directivas Europeas. Ponente Dra. Cristina Magli (Clínica SISMER, Bologna).

09:40 - 10:20 hrs. Ponencia II: Manejo de pacientes con enfermedades infecciosas en laboratorio de Reproducción Asistida. ¿Representa realmente un riesgo en el laboratorio? Ponente Dr. Fernando Marina (I. de Reproducción CEFER, Barcelona)

10:20 - 11:00 hrs. Ponencia III: Métodos no invasivos de evaluación de la calidad embrionaria. Respirometría. Ponente Dra. Lynette Scott (Reading, MA, USA)

11:00 - 11:30 hrs. Pausa café.

11:30 - 13:10 hrs. Comunicaciones Orales. Sesión Embriología Moderadores: M^a José Escribá (Valencia) – Ezequiel Pérez Campos (SEC).

11:30 - 11:40 hrs. Comunicación 0-001 - Análisis de la calidad ovocitaria mediante el consumo de oxígeno; relación con fecundación, desarrollo y calidad embrionaria. A. Tejera, J. Herrero, P. Romero, M. J. de los Santos, J. Remohí, M. Meseguer. (IVI, Valencia)

11:40 - 11:50 hrs. Comunicación 0-002 - Análisis de la inducción de la reacción acrosómica en el espermatozoide humano mediante el uso de ZP3 recombinante expresada en diferentes líneas celulares de ovario de hámster chino con glicosilación modificada. M. T. Zomeño-Abellán, M. A. Ramírez, A. Gutiérrez-Adán, M. J. Izquierdo-Rico, M. Jiménez-Movilla, J. L. Girela, M. J. Gómez-Torres, J. De Juan, J. Ballesta, J. C. Martínez, J. Landeras, M. Avilés. (F. Medicina, UM, Murcia)

11:50 - 12:00 hrs. Comunicación 0-003 - Fertilidad previa en donantes de ovocitos: ¿factor predictivo de embarazo? L. Echeverría, E. Clua, M. Boada, L. Latre, F. Martínez, A. Veiga. (USP Institut Universitari Dexeus, Barcelona)

12:00 - 12:10 hrs. Comunicación 0-004 - Identificación de embriones de ratón mediante micropartículas codificadas de polisilicio. S. Novo, R. Gómez, L. Barrios, M. Duch, J. Esteve, J. A. Plaza, J. Santaló, C. Nogués, E. Ibáñez. (F. Biociències, UAB, Barcelona)

12:10 - 12:20 hrs. Comunicación 0-005 - Diferencias en la expresión génica y localización de los precursores proteicos de los péptidos opioides POMC y PDYN en espermatozoides humanos. N. Subirán, F. M. Pinto, J. L. de Pablo, M. Fernández-Sánchez, M.L.Candenas, J. Irazusta. (UPV/EHU. Leioa, Bizkaia)

12:20 - 12:30 hrs. Comunicación 0-006 - Aplicación de la tecnología del embrioscope para la cuantificación de la calidad ovocitaria mediante el análisis de los patrones de respiración. J. Herrero, A. Tejera, J. M. de los Santos, M. J. de los Santos, A. Pellicer, M. Meseguer. (IVI, Valencia)

12:30 - 12:40 hrs. Comunicación 0-007 - El cultivo de embriones en bajas tensiones de oxígeno, mejora las tasas de gestación e implantación en ciclos de donación de ovocitos: Resultados preliminares. P. Gámiz, A. Tejera, J. M. De Los Santos, S. Pérez, C. Albert, P. Romero, M. J. De Los Santos. (IVI, Valencia)

12:40 - 12:50 hrs. Comunicación 0-008 - Influencia de la multinucleación en las tasas de implantación y de aborto en un programa de fecundación In Vitro. C. Alonso, M. Lara, B. Buch, C. Segura, R. Garnica, M. Martínez-Moya. (UR, Centro Gutenberg, Málaga)

12:50 - 13:00 hrs. Comunicación 0-009 - Resultado acumulado tras la transferencia de embriones re-vitrificados en ciclos de donación de ovocitos de banco. A. Mifsud, D. Castelló, N. Grau, M. Meseguer, J. M. de los Santos, A. C. Cobo. (Instituto Universitario IVI, Valencia)

13:00 - 13:10 hrs. Comunicación 0-010 - Congelación lenta vs. Vitriificación con Cryotop en día 3 de desarrollo y blastos estadio de blastocisto. Resultados del 2008 en el IVI Madrid. L. Herrero, S. Pareja, C. Losada, M. Jiménez, J. Fernández, Y. Mínguez. (IVI, Madrid)

13:10 - 14:00 hrs. Simposium Satélite. EMB-Nidacon.

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

JUEVES, 26 DE NOVIEMBRE - TARDE

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

16:00 - 17:20 hrs. Sesión Andrología. Moderadores: Miguel Ruiz (Valencia) - Ferran García (ASESA).

16:00 - 16.40 hrs. Ponencia I: Marcadores moleculares de calidad espermática. Ponente. Dr. Marcos Meseguer (IVI, Valencia).

16:40 - 17:20 hrs. Ponencia II: Integridad del ADN espermático y su efecto sobre la calidad embrionaria. ¿Es clínicamente útil? Ponente Dr. Jorge Ten (Instituto Bernabeu, Alicante)

17:20 - 18:20 hrs. Sesión de Pósters.

18:00 hrs. Cierre mesa electoral ASEBIR.

18:20 - 19:30 hrs. Comunicaciones Orales. Sesión Andrología. Moderadores: Joaquín Moreno (Valencia) -Nieves Cremades (Alicante).

18:20 - 18:30 hrs. Comunicación O-011 - Patrón de expresión génica diferencial entre muestras de semen que consiguen o no embarazo con la misma cohorte oocitaria en ciclos de ICSI con ovocitos Donados. S. García-Herrero, N. Garrido, J. A. Martínez-Conejero, A. Pellicer, J. Remohí, M. Meseguer. (IVI, Valencia)

18:30 - 18:40 hrs. Comunicación O-012 - Relación entre la fragmentación del DNA espermático y las tasas de implantación, embarazo evolutivo y aborto en ciclos de FIV. C. Puche, A. Rabanal, C. Castelló, A. Busquets, A. Farreras, E. Toro, E. Vellilla, F. García, M. López-Teijón, J. G. Álvarez. (Instituto Marqués, Barcelona)

18:40 - 18:50 hrs. Comunicación O-013 - Asociaciones entre metabolitos urinarios de ftalatos [Di(2-etilhexil) ftalato (DEHP)] y niveles de hormonas reproductivas en varones fértiles. J. Mendiola, N. Jørgensen, A. M. Andersson, F. Liu, S. H. Swan. University of Rochester Medical Center, New York, USA)

18:50 - 19:00 hrs. Comunicación O-014 - Efecto del tabaco sobre la oxidación del ADN espermático y su defensa contra el estrés oxidativo. T. Vilorio, M. Meseguer, J. A. Martínez-Conejero, P. Romero, J. Remohí, N. Garrido. (IVI, Valencia)

19:00 - 19:10 hrs. Comunicación O-015 - La Met-enkefalina se expresa en espermatozoides humanos y regula la movilidad espermática por vía de los receptores opioides. N. Subirán, M. L. Candenás, E. Agirregoitia, F. M. Pinto, J. L. de Pablo, C. G. Ravina, J. Irazusta. (UPV/EHU. Leioa, Bizkaia)

19:10 - 19:20 hrs. Comunicación O-016 - Validación de un nuevo sistema automático para el estudio de aneuploidías en espermatozoides. S. Santillán, X. Vendrell, E. García-Mengual, M. Pérez Alonso. (Sistemas Genómicos. Valencia)

19:50 - 19:30 hrs. Comunicación O-017 - Relación entre las vacuolas nucleares observadas por alta magnificación en espermatozoides y la fragmentación del ADN espermático. M. González, M. Dorado, M. Hebles, B. Migueles, L. Aguilera, F. Sánchez, J. A. Lara, A. Rodríguez, P. Sánchez. (Clínicas GINEMED, Sevilla)

VIERNES, 27 DE NOVIEMBRE - MAÑANA

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

08:30 - 10:30 hrs. Sesión Genética y Reproducción. Moderadores: Begoña Arán (Barcelona) - Carmen Rubio (Valencia).

08:30 - 09.10 hrs. Ponencia I: Uso de Microarrays en Diagnóstico Genético Preimplantacional
Ponente: Dr. Carles Giménez (Reprogenetics Spain, Barcelona).

09:10 - 09:50 hrs. Ponencia II: Qué nos aporta el análisis genético en espermatozoides en la pareja infértil.
Ponente Dr. Joan Blanco (UAB, Barcelona)

09:50 - 10:30 hrs. Ponencia III: Infertilidad y genética: Producción de gametos a partir de células madre embrionarias.
Ponente Dra. Anabel Marqués (C. de Investigación Príncipe Felipe, Valencia)

10:30 - 11:00 hrs. Pausa café.

11:00 - 11:50 hrs. Comunicaciones Orales. Sesión Genética y Reproducción Moderadores: Montserrat Boada (Barcelona) - Ana Monzó (SEF)

11:00 - 11:10 hrs. Comunicación O-018 - Blastocistos vitrificados procedentes de Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) como fuente para la derivación de células madre embrionarias (CME). M. Solé, B. Aran, M. Parriego, I. Rodríguez-Pizà, J. Santaló, M. Boada, B. Coroleu, A. Veiga. (I. U. Dexeus, Barcelona)

11:10 - 11:20 hrs. Comunicación O-019 - Hibridación genómica comparada en célula única (SC CGH): nueva herramienta para el screening genético preimplantacional (SGP). B. Lledó, J. A. Ortiz, R. Morales, R. Bernabeu. (Instituto Bernabeu Biotech, Alicante)

11:20 - 11:30 hrs. Comunicación O-020 - Correlación entre las anomalías cromosómicas observadas en espermatozoides y en embriones preimplantatorios. L. Rodrigo, V. Peinado, E. Mateu, M. Milán, P. Mir, N. Al-Asmar, M. Gil-Salom, C. Rubio. (IVI, Valencia)

11:30 - 11:40 hrs. Comunicación O-021 - Estudio de embriones cromosómicamente alterados procedentes de ciclos de FIV-DGPI y su relación con el tipo de anomalía meiótica. A. Colomar, S. Fernández, E. Toro, O. Serra, F. Del Rio, G. López, M. Brassesco, J. G. Álvarez, M. López-Teijón, E. Vellilla. (Institut Marquès, Barcelona)

11:40 - 11:50 hrs. Comunicación O-022 - Translocaciones robertsonianas: estudio de segregación y efecto inter cromosómico en embriones preimplantacionales. A. R. Jiménez-Macedo, L. Rabinad, E. García-Guixé, C. Giménez, M. Sandalinas. (Reprogenetics Spain, Barcelona)

11:50 - 12:35 hrs. Simposium Satélite. ORIGIO MediCult Media.

12:35 - 14:00 hrs. ASAMBLEA ASEBIR

14:00 - 16:00 hrs. Comida congresual

VIERNES, 27 DE NOVIEMBRE - TARDE

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

16:00 - 16:40 hrs. Sesión Aula Virtual. Moderadores: Victoria Hurtado de Mendoza (Sevilla) – Jesús Zulategui (Valencia)

Uso y aplicación de clínica de la luz polarizada en Reproducción. Ponente: Dra. Gemma Arroyo (Institut Universitari Dexeus, Barcelona).

16:40 - 17:20 hrs. Sesión Debate. Moderadores: Victoria Hurtado de Mendoza (Sevilla) – Pilar Gámiz (Valencia)

Mitos y Leyendas en el laboratorio de Embriología Clínica: Efecto perjudicial de la luz del laboratorio sobre los embriones humanos.

Ponentes: Dr. Antonio Urries (Clínica Quirón, Zaragoza). Dr. Emilio Gómez (TAHE Fertilidad, Murcia).

17:20 - 17:40 hrs. Pausa café.

17:40 - 17:55 hrs. Premio IVI al Mejor Póster 2009 (Auditorio III - Sala Póster) Entregará el premio la Dra. Amparo Ruiz (IVI, Valencia)

18:00 - 19:00 hrs. Comunicaciones Orales. Ovocito como objeto de investigación. Moderadores: Arancha Galán (Valencia) - Jorge Ten (Alicante).

18:00 - 18:10 hrs. Comunicación O-023 - Efecto de la vitrificación con "Cryotop" sobre la configuración del huso meiótico "in vivo". J. F. Zulategui, M. J. de los Santos, V. García, A. Galán, J. L. Romero, A. C. Cobo. (IVI, Valencia)

18:10 - 18:20 hrs. Comunicación O-024 - Efecto del proceso de vitrificación sobre la estructura del huso meiótico y organización cromosómica en ovocitos humanos en metafase II. C. C. Duque, J. Alfonso, R. P. Cervera, A. Monzó, V. Montañana, R. Moreno, M. Stojkovic, A. Romeu. (URH Hospital Universitario la Fe, Valencia)

18:20 - 18:30 hrs. Comunicación O-025 - Estudio mediante Embryoscope de la maduración nuclear de oocitos VG recuperados de ciclo estimulado. Efecto del envejecimiento oocitario in vitro sobre la competencia citoplasmática. N. Grau, L. Escrich, T. Vitoria, P. Gamiz, M. Borges, M. J. Escribá. (IVI, Valencia)

18:30 - 18:40 hrs. Comunicación O-026 - Metabólica del líquido folicular procedente de ciclos naturales y estimulados mediante Resonancia Magnética Nuclear de alta resolución. V. García-Laez, E. Piñero-Sagredo, M. J. de los Santos, V. Esteve, B. Celda. (IVI, Valencia)

18:40 - 18:50 hrs. Comunicación O-027 - Resultados del estudio de la tasa de aneuploidías en ovocitos de donante tras análisis del primer y segundo corpúsculo polar mediante FISH. E. Velilla, A. Colomar, S. Fernández, E. Toro, A. Casanovas, O. Serra, R. Olivares, M. López-Teijón. (Institut Marquès, Barcelona)

18:50 - 19:00 hrs. Comunicación O-028 - Los ovocitos humanos expresan los receptores cannabinoides CB1 y CB2 y su localización varía en los diferentes estados de maduración ovocitaria. L. Peralta, E. Agirregoitia, R. Mendoza, A. Expósito, R. Matorras, N. Agirregoitia. (Dpto. Fisiología, F. Medicina y Odontología UPV/EHU, Leioa, Bizkaia)

19:00 - 19:30 hrs. Exposición Premios ASEBIR-EMB 2007. Moderadores: Mark Grossman i Camps (Barcelona) - M^a José de los Santos (Valencia)

19:00 - 19:15 hrs. Premio ASEBIR-EMB de Investigación Básica 2007 "Incidencia de anomalías epigenéticas de los loci H19 y SNRPN en espermatozoides de individuos que consultan por problemas de fertilidad" Ponente: Dra. Marta Pladevall Sierra (UAB, Barcelona)

19:15 - 19:30 hrs. Premio ASEBIR-EMB de Embriología Clínica 2007 "Vitrificación y hatching asistido" Ponente: Dra. Empar Ferrer Robles (CREA, Valencia)

19:30 - 20:00 hrs. Clausura V Congreso de ASEBIR 2009 por parte del Dr. Mark Grossmann, Presidente de ASEBIR y la Dra. M^a José de los Santos, Presidenta del Comité Organizador.

21:30 hrs. Cena de Clausura, anuncio y entrega de los Premios ASEBIR-EMB 2009 por parte del Sr. Sergio Oliveró (Dir. Gral. Grupo EMB) y la Dra. M^a José de los Santos (Pta. Comité Organizador)

ESTADO ACTUAL DEL GRUPO DE INTERÉS DE CALIDAD EMBRIONARIA. ACTUALIDAD DE LA CLASIFICACIÓN DE ASEBIR

Dr. Jorge Cuadros. Clínica FIV Madrid

El año 2005, en el Congreso de ASEBIR de Zaragoza, M^a Jose Torelló presentó una ponencia donde se comunicaban los resultados de un año de trabajo de la Comisión "Definición de criterios de valoración morfológica y su categorización, de oocito a blastocisto", cumpliendo el encargo de la Junta Directiva de ASEBIR de alcanzar un consenso para la clasificación de los embriones humanos, valorando las características de los oocitos y de los preembriones desde cigoto hasta blastocisto. Hasta entonces, no existía una clasificación universalmente aceptada, mediante la cual se pudiera seleccionar los embriones con mayor potencial de implantación, para la transferencia embrionaria.

Hasta entonces, y hasta la fecha, las características morfológicas de los oocitos y embriones se han utilizado para alcanzar este objetivo, seleccionar los mejores embriones para conseguir, sobre todo, un embarazo único. Sin embargo, son numerosos los parámetros morfológicos que podrían ser valorados y, de hecho, diferentes laboratorios alrededor del mundo han escogido diferentes parámetros para la selección embrionaria. A parte de parámetros ya clásicos, como el número de células, el porcentaje y tipo de fragmentación citoplásmica, el tamaño de las células y la ausencia de multinucleación, se han utilizado otros parámetros como la distribución de los cuerpos precursores nucleolares, la división temprana, el inicio de adhesión en día 3, y otros más. Inclusive hay quienes han sugerido la posibilidad de seleccionar los cigotos o embriones con una sola imagen puntual, como podría ocurrir en el estadio de pronúcleos. En algunos casos esto ha surgido por las exigencias legales de algunos países.

Ante la diversidad de sistemas de clasificación y sistemas de puntuación, en muchos casos sólo útiles a nivel

interno en el laboratorio, surgía el problema de la dificultad para intercambiar información entre laboratorios para, por ejemplo, desarrollar estudios multicéntricos, haciéndose necesario, en el caso de la literatura científica, tener muy claro cómo se seleccionan los embriones en cada artículo, para comprender el alcance de los resultados. También hay que llamar la atención sobre los resultados, en muchos casos contradictorios, respecto de la capacidad de algunos de los parámetros sugeridos para determinar el potencial de implantación de los embriones.

En este contexto, la Comisión "Definición de criterios de valoración morfológica y su categorización, de oocito a blastocisto" realizó un esfuerzo para alcanzar ese consenso que pudiera ser aceptado de manera general por cualquier laboratorio. Siendo un acuerdo de mínimos, tuvimos en cuenta la posibilidad de que los embriólogos clínicos expertos echaran de menos algún parámetro que ellos utilizaran en sus laboratorios. Sin embargo, esperábamos que nadie tuviera reparos en aceptar los parámetros sugeridos como determinantes de la calidad de los embriones.

Y así se presentó el sistema de clasificación embrionaria, ahora conocido como "clasificación ASEBIR". La aceptación general fue muy positiva; sin embargo, nada más cumplido este encargo, la primera conclusión a la que llegamos dentro de la Comisión, cuya función se extinguía, fue que realmente no habíamos terminado el trabajo, que no habíamos hecho nada más que empezar, y que era imperativo continuar esta labor, para lo cual solicitamos a la Junta Directiva de ASEBIR la constitución del Grupo de Interés "Calidad Embrionaria".

El trabajo realizado por la Comisión, luego Grupo de Interés, se plasmó en el

II Cuaderno de Embriología Clínica de ASEBIR "Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos", cuya 2ª edición se imprimió en 2007. En este tiempo, el Grupo ha pasado de los 10 integrantes de la Comisión, a 14 miembros pertenecientes a centros de reproducción asistida de toda España, y hemos revisado algunos de los aspectos que no fueron concluyentes en el trabajo inicial.

Por ejemplo, realizamos ya una nueva revisión exhaustiva de la literatura sobre la división temprana. La primera revisión, que se encuentra en el II Cuaderno de Embriología Clínica, no permitió concluir si la división temprana es o no determinante del potencial de implantación embrionaria. En esta segunda revisión tampoco encontramos suficientes argumentos en la literatura como para modificar lo establecido inicialmente. No se ha demostrado fuera de toda duda que la división temprana sea determinante de la calidad embrionaria. Sin embargo, podemos mantener como recomendación que, una vez que se haya realizado la selección de los mejores embriones en base a las características morfológicas elegidas, entre embriones de calidad similar se podría escoger los que hayan presentado división temprana a las 24-27 horas.

De esto, también dedujimos, en este punto, que la manera de profundizar en el conocimiento del embrión debía ser con nuestros propios datos, evaluando en nuestros propios laboratorios la eficacia de la clasificación ASEBIR. Por lo tanto, en el Grupo de Interés "Calidad Embrionaria" decidimos evaluar las tasas de implantación de los embriones según las categorías establecidas en la clasificación ASEBIR (A, B, C y D), en un estudio multicéntrico realizado por los propios miembros del grupo de interés, entre el 8 de Enero y el 31 de Marzo de 2009. Este estudio comprendió más de 1000

transferencias embrionarias, con alrededor de 2000 embriones transferidos. Los criterios de inclusión para los ciclos de fecundación in vitro fueron las transferencias homogéneas, donde los embriones transferidos tuvieran la misma categoría según la clasificación ASEBIR (A, B, C o D), o las transferencias mixtas, donde los embriones transferidos podrían ser de diferente categoría ASEBIR, sólo si la implantación embrionaria hubiera sido del 0% o del 100%.

Los objetivos establecidos para este estudio multicéntrico fueron los siguientes:

Análisis de la tasa de implantación de los embriones transferidos según la clasificación ASEBIR.

Análisis de la tasa de implantación de las diferentes categorías ASEBIR, en función de la edad de la mujer, estableciéndose

los grupos de edad de <30, 30-34, 35-39, 40-44 y >44.

Análisis de la tasa de implantación dentro de una categoría ASEBIR, según los parámetros morfológicos observados.

Análisis de la influencia de la multinucleación en la clasificación ASEBIR.

En última instancia, el objetivo final de este estudio sería la confirmación, o en su defecto la modificación, de lo establecido en las diferentes categorías de la clasificación ASEBIR.

Los resultados obtenidos, después de una primera valoración de los datos recogidos de los diferentes centros de reproducción asistida que participaron en este estudio, han servido, de forma general, para confirmar la validez de la

clasificación ASEBIR. Estos resultados preliminares han sido los siguientes:

La tasa de implantación embrionaria disminuye a medida que disminuye la categoría ASEBIR, independientemente de la edad de la mujer.

Los embriones de categoría A y B se comportan de manera óptima en los grupos de edad de <30 y 30-34 años.

La tasa de implantación de los embriones de categoría C desciende en los diferentes grupos de edad.

La disminución de la tasa de implantación en los embriones de categoría D se hace más drástica; sin embargo, siendo de alrededor del 10%, no es despreciable.

En el momento de la redacción de este texto, estos resultados, aún

MediCult es una empresa especializada en el desarrollo y fabricación de medios de cultivo para Técnicas de Reproducción Asistida. Ofrece productos y medios para la recuperación de ovocitos, tratamiento del esperma, cultivo de embriones, criopreservación y Maduración In Vitro de ovocitos.

MediCult le ofrece calidad de producto, servicio e innovación.

MediCult España S.L.

Gran Vía Corts Catalanes 184, 7 · 08038 Barcelona · Spain

Tel.: +34 93 394 53 91 · Fax: +34 93 394 53 80

www.medicult.com



MediCult

Innovation with Care

Jorge Cuadros. Clínica FIV Madrid

12

preliminares, están siendo procesados para la valoración de las significancias estadísticas de las diferencias observadas en las tasas de implantación de los embriones según su categoría ASEBIR. Sin embargo, lo obtenido hasta el momento apunta a la confirmación de la eficacia de la clasificación ASEBIR

para seleccionar los embriones con mayor potencial de implantación para la transferencia embrionaria.

Con los resultados definitivos de la evaluación estadística, que serán presentados en el V Congreso Nacional ASEBIR de Valencia, esperamos que estas

aseveraciones se confirmen, aunque éste sólo será un paso más en la comprensión del embrión humano. Estamos seguros de que este trabajo tendrá que continuar, en ese camino, aún utópico, de "un embrión, un niño en el parque".

INDICADORES LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA CLÍNICA

Dr. Juan Manuel Moreno¹, Dr. Manuel Ardoy², Dr. José Antonio Castilla³ y Dr. Emilio Gómez⁴

¹ Hospital-Clínica Vistahermosa, Alicante

³ Hospital Virgen de las Nieves, Granada

² Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid

⁴ TAHE Fertilidad, Murcia

INTRODUCCIÓN

La elaboración de unos Indicadores de Calidad pretende ofrecer al embriólogo una herramienta con la que medir y

evaluar la "calidad" de su trabajo en el laboratorio. En este sentido, los estándares deben ser considerados como orientativos de la meta a alcanzar, pero nunca como una exigencia. Por ello

los Indicadores no deben ser interpretados como herramientas de control de nuestra labor sino más bien como un sistema de autoevaluación, que somos libres de utilizar o no, pero que

Sistemas Genómicos compañía líder en análisis de ADN

Servicio integral de Genética aplicado a la Medicina

- Experiencia y capacidad tecnológica para el abordaje diagnóstico de cualquier enfermedad de base genética conocida
- Centro de referencia internacional para el diagnóstico de enfermedades genéticas

GENÉTICA MÉDICA

Nuevas herramientas diagnósticas para la mejora de su práctica clínica

CONSEJO GENÉTICO

DIAGNÓSTICO GENÉTICO

DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRENATAL

ENFERMEDADES RARAS

CÁNCER HEREDITARIO

GENÉTICA ONCOHEMATOLÓGICA

ESTUDIOS GENÉTICOS A MEDIDA

GENÉTICA REPRODUCTIVA

Una manera sencilla de ofrecer DGP a sus pacientes

DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL (DGP)

Detección de aneuploidias
Determinación del sexo embrionario
Anomalías cromosómicas estructurales
Enfermedades monogénicas
Tipaje HLA

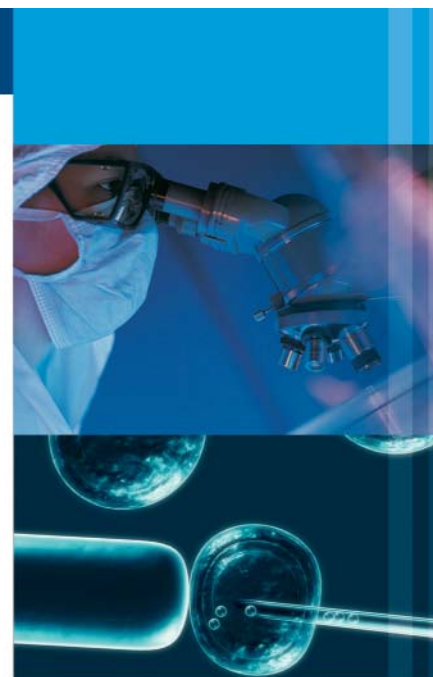
INFERTILIDAD GENÉTICA

ESTUDIOS GENÉTICOS PARA DONANTES DE GAMETOS Y EMBRIONES

CONSEJO GENÉTICO REPRODUCTIVO

 **sistemas genómicos**
BIOMÉDICA

Parque Tecnológico de Valencia
Ronda G. Marconi, 6
46980 PATERNA (Valencia)
Tel. 902 364 669 · Fax 902 364 670
info@sistemasgenomicos.com
www.sistemasgenomicos.com



Solicite nuestro catálogo
902 364 669

empleado correctamente nos va a permitir analizar y cuantificar cómo es y cómo está nuestro laboratorio, y en caso necesario cuales son los aspectos a mejorar, cambiar o utilizar adecuadamente.

Indudablemente, los estándares establecidos no son definitivos, y al igual que los protocolos, deben ser revisados y adaptados periódicamente en la misma medida en que cambia la práctica asistencial y la evidencia científica.

Aún así, hay que considerar los indicadores de calidad como una herramienta de trabajo indispensable para nuestro quehacer diario profesional.

MATERIAL Y MÉTODOS

Dado que un indicador es un instrumento de medida, que utilizaremos de forma sistemática y cuyo resultado será tenido en cuenta en la gestión de calidad, tendremos que asegurarnos que refleje la realidad.

Para ello hay que tener en cuenta tres propiedades que debe reunir todo indicador para considerarlo útil:

Validez: identifica situaciones en que se podría mejorar la calidad del proceso a evaluar.

Sensibilidad: detecta todos los casos en que se produce una situación o problema real de calidad.

Especificidad: detecta sólo aquellos casos en que existen problemas de calidad.

Estos aspectos deben ser tenidos en cuenta cuando se procede a la construcción de indicadores, seleccionando aquellos con mayor nivel de validez, sensibilidad y especificidad.

Además, para la construcción de indicadores, es recomendable definir y considerar una serie de apartados que serán de gran ayuda para seleccionar aquellos que reúnan las mejores características:

- Nombre del Indicador
- Dimensión

- Justificación
- Fórmula
- Explicación de términos
- Población
- Periodicidad
- Tipo
- Fuente de datos
- Estándar
- Comentarios

Dimensión: Característica o atributo del indicador para que sea considerado de calidad.

Justificación: Utilidad del indicador como medida de la calidad. Se relaciona con la validez; es decir, lo que vamos a medir ¿tiene sentido?

Fórmula: Expresión matemática que reflejará el resultado de la medición. Habitualmente se expresa en forma de porcentaje, pero también puede hacerse como una media o número absoluto.

Explicación de términos: Definición de aquellos aspectos del indicador que puedan ser ambiguos o sujetos a diversas interpretaciones.

Población: Descripción de la unidad de estudio que van a ser objeto de medida. En algunas ocasiones será necesario introducir criterios de exclusión en la población así definida.

Periodicidad: Para realizar la cuantificación del indicador, no es necesario hacer la medición sobre la totalidad de la población definida sino que se recurre a la revisión de una muestra. Para elegir la muestra es necesario que el resultado del indicador sea considerado representativo de la población definida.

Tipo: Se refiere a la clasificación de indicadores según el enfoque de la evaluación. Se identifica como de estructura, proceso o resultado.

Fuente de datos: Define cuál será el origen de la información y la secuencia de obtención de datos necesaria para poder cuantificar el indicador.

Estándar: Refleja el nivel deseado de cumplimiento para el indicador. Nos referimos siempre a este apartado con la expresión "estándar orientativo", dada

la variabilidad de las fuentes bibliográficas consultadas, que no siempre coinciden o presentan un amplio intervalo de resultados.

Comentarios: Este apartado se reserva para las reflexiones a la validez del indicador o a poner de manifiesto posibles factores de confusión que deberán ser tenidos en cuenta a la hora de interpretar los resultados.

RESULTADOS

Evidentemente, todos los indicadores expuestos en "Datos para la normalización de los resultados del laboratorio de reproducción humana", listado de datos elaborado por una comisión del "Grupo de Interés de Calidad Embrionaria", son necesarios en un laboratorio; pero hemos considerado oportuno empezar con los que son verdaderamente útiles y dejar para más adelante el resto.

Los indicadores seleccionados son los siguientes:

ANDROLOGÍA

- % de REM
- Test de descongelación

EMBRIOLOGÍA

- % de fecundación normal por ICSI
- % de fecundación normal por FIV
- % de fallo total de fecundación normal (ICSI/FIV)
- Bloqueo en pronucleos
- Tasa de supervivencia embrionaria (CRIOPRESERVACIÓN)

GESTACIÓN

- % de gestación clínica
- Tasa de implantación

CONCLUSIONES

Durante la ponencia se irán definiendo cada uno de los indicadores seleccionados.

ESTADO ACTUAL DEL GRUPO DE INTERÉS DE DGP

Dra. Esther Fernández García - Geniality Diagnóstico Genético. Madrid

E-mail: efgarcia@geniality.es

Grupo de Interés de Diagnóstico Genético Preimplantacional: Dra. Esther Fernández, Dr. Carles Giménez, Dra. Carmen Rubio.

Vocales: Dra. Mònica Parriego, Dra. Lorena Rodrigo, Dra. Esther Velilla y Dr. Xavier Vendrell.

INTRODUCCIÓN

En octubre de 2001 en el seno del primer Congreso de ASEBIR (Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción) se creó el grupo de interés de Diagnóstico Genético Preimplantacional (GIdgp) con el objeto de recopilar la información de todos los centros implicados en el DGP y poder valorar la situación del DGP en nuestro país. Desde entonces hasta ahora la aplicación de las técnicas de DGP se ha visto incrementada año tras año. Después del primer registro realizado en 2005 (III Congreso de ASEBIR en Zaragoza), donde se recogían los ciclos de DGP realizados desde Abril de 1993, hasta Septiembre del año 2005 (11 Centros). En 2007 (IV Congreso de ASEBIR en Bilbao) el GIdgp presentó el segundo registro de datos donde se recogían los ciclos de DGP realizados en España desde Septiembre de 2005 a Diciembre de 2006 (27 Centros). Este registro, actividad principal del GIdgp, se ha actualizado y de nuevo en 2009, esta vez en Valencia en nuestro V Congreso Nacional, presentamos los datos de los ciclos de DGP realizados en nuestro país del 1 enero al 31 diciembre de 2006, recogidos por 32 Centros. Aunque el esfuerzo en la participación ha sido mayor, no podemos olvidar que en España hay un total de 229 Centros de Reproducción Asistida (Dato publicado en la página web de ASEBIR).

Sin embargo estos dos últimos años el GIdgp, ha visto incrementada su actividad, como no podía ser de otro modo, teniendo una participación activa a todos los niveles, tanto en la Administración, colaborando como expertos en diferentes reuniones de la Comisión Nación de Reproducción Asistida, como a nivel de Asociaciones Científicas con la creación de la Comisión

de DGP en la Asociación Española de Genética Humana (AEGH), y en el panorama Científico con la publicación de una carta al editor en el Human Reproduction y en nuestra revista de ASEBIR.

El grupo de interés de DGP de ASEBIR, ha cumplido ya 8 años, el camino andado nos da la proyección de lo que llegaremos a ser, como siempre, con la colaboración de todos vosotros.

A continuación presentamos un resumen de las distintas actividades del grupo de interés que han tenido lugar a lo largo de 2008 y 2009.

RECOGIDA DE DATOS DE DGP CORRESPONDIENTE AL AÑO 2006.

Lo primero de todo agradeceremos a todos los socios la participación en la nueva recogida de datos correspondiente al año 2006. En este caso han sido 32 los centros que han participado (Tabla I). Se han presentado un total de 1917 ciclos (Tabla II), de los cuales 1665 ciclos corresponden a ciclos de Screening de Aneuploidías (Tabla III), y 252 ciclos corresponden a ciclos de DGP con indicaciones genéticas conocidas que tienen riesgo de herencia a la descendencia. De ellos 124 ciclos corresponden a reorganizaciones cromosómicas (Tabla IV) y 128 ciclos al Diagnóstico Preimplantacional de enfermedades monogénicas (Tabla V).

CONTROVERSA DEL PGS: CARTA AL HUMAN Y A LA REVISTA ASEBIR, FUTURA CARTA PARA LA SEF.

En estos últimos dos años, todos hemos asistido a la crítica feroz a que ha sido sometida la técnica de DGP para el despistaje de aneuploidías que frecuentemente vemos referenciado

como PGS (del inglés, preimplantation genetic screening). Han sido varios los artículos que han querido poner de manifiesto la “no utilidad” de esta técnica en el campo de la reproducción humana. Lo más llamativo no ha sido la publicación casi al unísono de estos artículos, sino la buena aceptación que han tenido por parte de los profesionales de la Reproducción, sin profundizar en el diseño, la metodología o los resultados clínicos de los mismos. Estas técnicas, asociadas a la FIV, que llevan practicándose durante más de 15 años, en unos meses han sido desechadas sin contemplaciones.

Como no podía ser de otro modo, desde el Grupo de Interés en DGP de ASEBIR hemos estado muy pendientes y revisamos estos estudios en los que se concluía que la selección de embriones cromosómicamente normales, para un panel concreto de cromosomas, no mejoraba las tasas de embarazo por ciclo para las indicaciones de edad materna avanzada, fallo repetido de implantación o en pacientes de buen pronóstico de FIV.

Debido a la trascendencia que han tenido estas afirmaciones para aquellos que practicamos la medicina reproductiva, nuestro primer planteamiento fue responder de una manera constructiva mediante una carta al editor, que en estos momentos está aceptada para su publicación (The importance of good practice in preimplantation genetic screening: critical viewpoints. Human Reproduction, Vol.00, No.00 pp. 1–3, 2009), en la que hicimos hincapié en la importancia que “una buena práctica” puede tener en los resultados finales del PGS.

En el último número de la revista ASEBIR, por cierto muy interesante,

publicamos esta vez para todos los asociados de nuestra asociación, el debate creado y nuestras conclusiones finales, siendo conscientes que estas deliberaciones se tienen que plantear en el seno de la Ginecología Reproductiva, ya que es ahí donde más daño han causado estas afirmaciones. Queda por tanto pendiente la publicación en la SEF de los resultados que aquí se exponen y de nuestras conclusiones.

ACTIVIDAD EN LA CNRHA.

La Ley 35/1988, de 22 de noviembre, sobre técnicas de reproducción asistida, encomendó al Gobierno establecer, mediante real decreto, la creación de una Comisión Nacional de carácter permanente, dirigida a orientar sobre la utilización de estas técnicas y colaborar con la Administración en la recopilación y actualización de conocimientos científicos y técnicos y en fijar criterios de funcionamiento de los centros o servicios en los que se realizan estas técnicas.

La Comisión se creó mediante el Real Decreto 415/1997, de 21 de marzo, que regula su composición, competencias y funcionamiento en armonía con el contenido de aquella disposición legal.

La Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida, abrió la posibilidad de practicar nuevas técnicas y otras que en un futuro puedan surgir por los avances científicos. Esta apertura se realiza bajo estrictas garantías, entre las que se encuentra el reforzamiento del papel asesor de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida.

Por este motivo, se hizo necesario modificar el Real Decreto 415/1997, de 21 de marzo, recogiendo las funciones que la ley vigente añadía a la Comisión, incorporando vocales que por sus conocimientos contribuirán a su logro e instituyendo una Comisión Técnica Permanente que facilitará el trabajo del Pleno. Esta modificación del Real Decreto 415/1997, de 21 de marzo, tuvo lugar el día 6 de julio de 2007.

La Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida, ha tenido durante estos dos últimos años una actividad que

podríamos denominar frenética, si la comparamos con la actividad a la que nos tenía acostumbrados desde su creación (1997). Y lo que es más importante ASEBIR, con su presidente a la cabeza, Dr. Mark Grossmann, ha participado en diferentes reuniones y ha tenido un papel destacado en la elaboración de documentos:

4 de diciembre de 2008, la CNRHA decide formar un Grupo de Trabajo ad-hoc para el estudio de Diagnóstico Genético Preimplantacional y Cáncer hereditario.

2008, Propuesta para la creación de la Tabla de recogida de datos de DGP armonizada para todas las CCAA. Esta propuesta está pendiente de su aprobación por el Ministerio de Sanidad y Política Social. (página web)

11, Marzo de 2009, reunión del Grupo de trabajo ESTUDIO DE DGP Y CANCER HEREDITARIO. En este grupo de trabajo participan entre otros, Montserrat Boada (representante española en ESHRE), Esther Fernández (presidenta del GIIdgp de ASEBIR) y Julio Martín (Experto en Genética del IVI de Valencia). A partir de esta reunión salió publicado en nota de prensa (21 de abril de 2009):

El Ministerio de Sanidad y Política Social da luz verde a una pareja que quiere tener un bebé libre de un cáncer de mama hereditario.

Primeros casos de cáncer hereditario que pasan por la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida.

La Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida da su visto bueno a la aplicación del diagnóstico genético preimplantacional en este caso y otro de neoplasia endocrina múltiple (cáncer hereditario de tiroides).

Es la primera vez que la Comisión estudia en España la posible aplicación de la selección genética de embriones en casos concretos de cáncer hereditarios graves, de desarrollo precoz y, en la mayoría de los casos, carentes de tratamiento.

La Comisión ha analizado otras 17 solicitudes para el uso del Diagnóstico

Genético Preimplantacional. De ellas, 6 son para su posible aplicación con fines terapéuticos (curar a un hermano).

Abril del 2009, ASEBIR recibe la SOLICITUD DE LA CNRHA DE ELABORAR UNA LISTA DE PRINCIPALES ENFERMEDADES MONOGENICAS. ASEBIR apoyado en su grupo de interés en DGP, recibe la solicitud de la Dirección General de Terapias Avanzadas y Trasplantes de elaborar una lista con las principales enfermedades monogénicas susceptibles de diagnóstico mediante DGP. Los expertos que participaron en la reunión de consenso celebrada el 4 de Mayo de 2009 fueron: Esther Fernández, Silvia Fernández, Carles Giménez, Julio Martín, Mónica Parriego, Esther Velilla y Xavier Vendrell, todos ellos miembros de ASEBIR y del grupo de interés en DGP, y Montse Boada y Mark Grossmann en representación de la Junta Directiva de ASEBIR.

ORGANIZACIÓN DE CURSOS PARA EL 2009 Y 2010: CURSO DE BIOPSIA EMBRIONARIA Y CURSO DE GENÉTICA PARA EMBRIÓLOGOS Y GINECÓLOGOS

Este año 2009 coincidiendo con la celebración del V Congreso ASEBIR, el GIIdgp inicia una nueva etapa docente con la puesta en marcha del primer Curso de Biopsia Embrionaria.

Es labor de la asociación y en concreto de su grupo de interés, poner a la disposición de los asociados el aprendizaje de las distintas técnicas de biopsia embrionaria, con el fin de introducirlas en la rutina del laboratorio de FIV, se trata de una técnica de micromanipulación embrionaria que está en manos de los profesionales de la reproducción asistida y son ellos los que deben iniciarse y llevarla a cabo con el fin de poder facilitar el DGP en los distintos Centros.

Para este primer curso contamos con la participación de Dres. por todos conocidos, que tratarán en cada caso de acercar la técnica de biopsia a los embriólogos.

Por un lado se tratarán aspectos Teóricos de las técnicas, este apartado correrá a cargo del Dr. Josep Santaló, y por supuesto aspectos prácticos donde se

podrá realizar la biopsia (Tyrode´s, mecánica y láser) y fijación de las células para los estudios con FISH, así como el tubing para los casos de PCR. Para la parte práctica contaremos con 9 monitores: Monitores biopsia: Esther Fernández (biopsia mecánica), Carles Giménez y Antonio Alcaide (biopsia Tyrode´s) y Mónica Parriego y Xavi Vendrell (biopsia láser). Monitores fijación: Esther Velilla, Josep Santaló, Antonio González-Utor y Carmen Rubio.

El lugar de celebración del curso será el Hotel Sorolla, situado junto al Palacio de Congresos. El número de Participantes en esta ocasión será de 16 a repartir en 8 puestos de trabajo.

Los Patrocinadores: IZASA, EMB, OLYMPUS, LEICA y DURVIZ

En el año 2010, el GIdgp se ha propuesto poner en marcha el Curso de Genética

para Embriólogos y Ginecólogos, del que os tendremos oportunamente informado en la web.

ACTIVIDAD Y NUEVA CREACIÓN DE COMISIÓN DE DGP EN LA AEGH

En el año 2007, el GIdgp presentó un poster en el "XXIV Congreso Nacional de la AEGH", dando a conocer todos los resultados recogidos desde ASEBIR. Después de esta experiencia, el GIdgp se planteó la necesidad de tener una participación activa y presencial dentro de la Asociación Española de Genética Humana (AEGH), sociedad de la cual muchos de nosotros somos socios desde hace años, y en donde cada vez adquieren mayor protagonismo las técnicas de DGP, sus indicaciones y resultados.

El paso siguiente fue el envío por parte del GIdgp de una Solicitud formal a la

Junta de la AEGH, para la creación de una Comisión de DGP donde se hacía referencia entre otras cosas: "Debido al enorme impacto social de la aplicación de estas técnicas, así como a lo novedoso de la tecnología que se está aplicando en estos casos, consideramos interesante y necesario la creación de una comisión dedicada expresamente al DGP dentro de la AEGH. Las indicaciones clínicas, la metodología y los avances que puedan aportar los grupos de expertos que practican estas técnicas resultan de radical importancia a la hora de transmitir a los usuarios, prescriptores y a la comunidad en general la situación actual del DGP en nuestro país."

Esta propuesta se realiza de forma presencial por Xavier Vendrell y Esther Fernández, a la Junta en la ASAMBLEA ORDINARIA DE MIEMBROS DE LA AEGH celebrada durante la "European Human Genetics Conference 2008", en

OLYMPUS
Your Vision, Our Future



La calidad, nuestro objetivo

MARQUE LA DIFERENCIA EN EL LABORATORIO CON LOS NUEVOS SISTEMAS DE CONTROL DE CALIDAD

Nuevos Sistemas Olympus IMSI
Evalúe la morfología del espermatozoide a altos aumentos con el mismo microscopio de ICSI



OCTAX polarAIDE

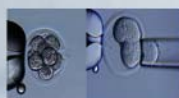
OCTAX polarAIDE evaluación automática de la calidad de los ovocitos

Visualización del huso y comprobación de la viabilidad de congelado-descongelado de los ovocitos en metafase II



pH Online™

Sistema de monitorización continua del pH en los incubadores a tiempo real.



OCTAX Laser Shot™

Sistema de laser diodo especialmente diseñado para técnicas de reproducción asistida.

Barcelona, el día 3 de junio de 2008. El 25 de noviembre de 2008, la Junta de la AEGH aprueba por unanimidad la creación de la Comisión de DGP. Aunque las personas que tuvimos la iniciativa de crear esta Comisión, nos presentamos para participar activamente en ella, fue la junta de la AEGH quien al final, eligió a los miembros de entre los posibles candidatos. Esta Comisión está formada por: Sandra Morfort, Ana Peciña López, Carmen Ramos Corrales, Carles Gimenez, Carmen Rubio y Esther Fernández. En Septiembre de 2009, tendrá lugar la primera reunión oficial de esta Comisión de DGP, de la que os mantendremos debidamente informados.

ACREDITACIÓN LABORATORIOS DGP

Debido a la trascendencia que este tema tiene para el GIDgp, aprovechamos la asistencia de tres personas Lorena, Monica y Trinidad estuvieron presentes en el Curso ESHRE Campus 2008, Brno Czech Republic, 23-24 October 2008 titulado: Quality Management System and Accreditation in PGD Clinics and Laboratories.

El principal objetivo del curso fue sensibilizar a los participantes de la importancia de la implementación de sistemas de calidad (QC) específicos para los laboratorios de DGP.

El objetivo de un sistema de calidad es asegurar la efectividad y reproducibilidad de todos los procesos realizados así como la competencia del personal para desarrollar las funciones que le han sido adjudicadas. Con este fin es posible identificar y corregir los posibles problemas que pudieran aparecer.

Existen distintos documentos/normativas que incluyen apartados específicos sobre calidad en Reproducción Asistida tanto a nivel nacional e internacional:

Nacional:

Real Decreto 1301/2006: es una transposición de las Directivas del Parlamento Europeo 2004/23/CE y 2006/17/CE por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban

las normas de coordinación y funcionamiento para su uso.

Internacional:

ESHRE guidelines for good practice in IVF laboratories
EN ISO 9001 certification
EN ISO 170 25 accreditation
EN ISO 151 89 accreditation

A nivel práctico, y dentro del ámbito del DGP, debemos distinguir entre certificación, autorización y acreditación, que son tres documentos distintos otorgados por entidades diferentes:

Certificación: Es el resultado de una inspección externa que verifica que un producto, proceso o servicio se ajusta a los requisitos definidos en las normas o especificaciones técnicas.

PERO la posesión de una certificación NO asegura la COMPETENCIA del laboratorio.

La Certificación la pueden emitir las empresas certificadoras acreditadas.

Autorización: La ley vigente sobre técnicas de reproducción humana asistida, 14/2006 establece en el artículo 12 sobre Diagnóstico Preimplantacional que podrán practicar dicha técnica los centros debidamente autorizados.

La emisión de dicha autorización corresponde a las Comunidades Autónomas (CA).

Acreditación: Proceso por el cual una autoridad da un consentimiento formal de que un laboratorio o una persona es COMPETENTE para llevar a cabo tareas específicas. Se otorgan a nivel nacional, en la mayoría de países no existe una acreditación específica para laboratorios de DGP.

La única autoridad competente para la acreditación en España es ENAC (Entidad Nacional de Acreditación). No existe tampoco una acreditación específica para laboratorios de DGP.

Así pues, en nuestro país, la autorización por parte de la CA es un requisito imprescindible para los laboratorios de DGP. A diferencia, la

certificación no resulta un requisito imprescindible, si bien queda establecido en el Real Decreto 1301/2006 (artículo 16) que los establecimientos deberán desarrollar y mantener actualizado un sistema de calidad y de gestión integrado. Dicho sistema de calidad debe incluir todos los puntos citados en el artículo y debe estar disponible para posibles inspecciones por parte de las autoridades sanitarias competentes.

Por otro lado, la ley 14/2006 establece en el artículo 19 que los centros de reproducción humana asistida deberán someterse a auditorías externas que evaluarán tanto los requisitos técnicos y legales. La periodicidad de dichas auditorías la establecerá cada CA. Hasta el momento, no era posible dentro del ámbito del DGP someterse a un control de calidad externo puesto que no había ninguno disponible. La aparición este año del External Quality Assessment (EQA) de la Cytogenetic European Quality Assessment abre la posibilidad que los laboratorios de DGP pasen un control externo, que evalúe su competencia. Si bien en la mayoría de CA no se ha establecido la periodicidad de las auditorías, sería recomendable que los centros que ofrecen DGP en España realizaran el EQA.

CREACIÓN DE UNA BASE DE DATOS PARA LA RECOGIDA DE DATOS DE DGP.

En la última Reunión del grupo de interés, que tuvo lugar en Bilbao en 2007, quedó patente que la recogida de datos y posterior exposición de los mismos, no debía ser el único objetivo de nuestro grupo. Éramos conscientes de la necesidad de contar con una base de datos donde no solamente pudiéramos incluirlos sino también sacar conclusiones.

Después de una consulta interna con los miembros del GIDgp y quedando pendiente el desarrollo de lo que será esa base de datos, Esther Fernández en nombre del grupo de interés mantiene contactos con Apara Creadores de Mercapús S.L. Apara es una empresa dedicada al desarrollo de aplicaciones informáticas y prestación de servicios de consultoría, que ha creado la gama de productos informáticos dLife y

derivados, aplicando dLife a diversas patologías, entre las que se encuentran algunas de las más importantes en cuanto a incidencia en la población se refiere, como son el caso de la Hepatitis C, la cardiología o los problemas de infertilidad.

La idea es que APARA ponga a nuestro servicio la plataforma dLife y que la adapte a nuestras necesidades sin que por ello ASEBIR tenga que desembolsar ninguna cantidad que no sea la dotación económica que le ofrece a los distintos grupos de interés.

En Marzo de 2009 dentro de la convocatoria de ayudas Acción Estratégica de Telecomunicaciones y Sociedad de la Información del plan AVANZA I+D, del Ministerio de Industria, Turismo y Comercio, Apara y Geniality (representando los intereses del GIdgp) presentan un proyecto para la realización de una plataforma biomédica llamado: dOne - Plataforma biomédica para diagnóstico genético preimplantacional de embriones humanos. (Número de Identificación del expediente: TSI-020100-2009-370).

Con fecha de 30 de junio de 2009, Apara recibe una notificación de la Propuesta de Resolución Provisional relativa al Subprograma Avanza I+D de esta convocatoria. Una vez terminado el proyecto de AVANZA en el año 2010, ASEBIR contará con una copia de la base de datos resultante para el análisis de los datos que recoge anualmente el GIdgp.

En este momento contamos con la aprobación provisional, empieza por tanto la segunda fase, la creación de la base de datos que nos permitirá a partir del año 2010, desde la web de ASEBIR, poder incluir anualmente los datos de DGP recogidos por los centros que deseen participar, de forma anónima, y poner a disposición de todos los resultados obtenidos.

Recogida de datos de GIdgp-2007
GINEFIV
CERHVO
IVI
AISA REPRODUCCIÓN
ALMERÍA FIV (U. R. HOSPITAL VIRGEN MAR)
CRA CLINICA SAGRADA FAMILIA
CENTRO MÉDICO TEKNON
CEFIVA GIJÓN
CEFIVA
CENTRO HISPALENSE DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA (CEHISPA)
CLÍNICA BAU
CLÍNICA EUSKALDUNA.
CLINICA MEDRANO
CLINICA SON MOIX
CREA
EMBRIOGYN
ESIMER
FECUNMED
FIVMADRID
FUNDACIÓ SANT
UNIDAD DE REPRODUCCION, CENTRO GUTENBERG,
INSTITUTO BALEAR DE INFERTILIDAD
INSTITUT IMARA
INSTITUT MARQUÈS
IVI
IVI
IVI
IVI
IVI
NORBA, GINECOLOGÍA Y REPRODUCCIÓN S.L.
HOSPITAL
CLINICA TAMBRE

Tabla I. 32 Centros participantes

	Abril 1993- Sep 2005 (17 centros)	Sep 2005 - Diciembre 2006 (27 centros)	Enero 2007 - Diciembre 2007 (32 centros)	TOTAL (%)
Nº de Ciclos	3373	2324	1917	7614
Nº Transferencias (%)	2262 (67)	1587 (68)	1151 (60)	5000 (66)
Nº de embarazos (%)	794 (35,1)	662 (42)	407 (35)	1863 (37)
Nº gemelares (%)	211 (26,5)	138 (21)	109 (27)	458 (24)
Nº multiples (%)	11 (1,4)	4 (0,6)	11 (2,7)	26 (1)
Nº abortos (%)	159 (20)	105 (16)	70 (17)	334 (18)
Nº RNV	526	517	377	1420

Tabla II. Resultados Globales

PGS	RAB	RFIVF	AMA	PTRI	FMF	FMM	FMS	TOTAL
Nº de Ciclos	303	236	743	28	84	168	83	1645
Nº Transferencias (%)	205 (68)	158 (67)	323 (43)	18 (64)	69 (82)	132 (78)	66 (79)	971 (59)
Nº de embarazos (%)	84 (41)	55 (35)	81 (25)	6 (33)	32 (46)	61 (46)	26 (39)	345 (35)
Nº gemelares (%)	23 (27)	20 (36)	12 (15)	3 (17)	7 (22)	15 (24)	6 (23)	86 (25)
Nº multiples (%)	2 (2)	4 (7)	2 (2)	0	1 (3)	1 (2)	0	10 (3)
Nº abortos (%)	18 (21)	12 (22)	14 (17)	0	4 (12)	11 (18)	5 (19)	64 (18)
Nº RNV	66	45	72	8	28	58	26	303

Tabla III. Screening de Aneuploidias (2007)

	Translocación no robertsoniana (RECT)	Inversiones (INV)	Translocación robertsoniana (ROBT)	Anomalias numéricas	TOTAL
Nº de Ciclos	50	13	44	17	124
% embriones anormales/afectos (Nº)	179	56	122	42	399
Nº Transferencias (%)	31	20	35	11	97
Nº de embarazos (%)	19	9	23	7	58
Nº gemelares (%)	4	6	9	1	20
Nº multiples (%)	0	0	0	0	0
Nº abortos (%)	0	0	1	2	3
Nº RNV	4	8	11	2	25

Tabla IV. Reorganizaciones Cromosómicas (2007)

			TOTAL
	PCR	FISH Ligada al X	
Nº de Ciclos	106	22	128
% embriones anormales/afectos (Nº)	168	71	239
Nº Transferencias (%)	90 (85)	17 (77)	107 (83)
Nº de embarazos (%)	32 (35)	5 (29)	37 (35)
Nº gemelares (%)	10 (31)	1 (20)	11 (30)
Nº multiples (%)	1 (3)	0	1 (3)
Nº abortos (%)	2 (6)	1 (20)	3 (8)
Nº RNV	38	5	43

Tabla V. Diagnóstico Preimplantacional de enfermedades monogénicas (2007).

REGISTRO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FERTILIDAD DE TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Dr. Jose A. Castilla, Dra. Yolanda Cabello, Dra. Juana Hernández, Dr. Jose Luis Gómez, Dr. Javier Marqueta, Dra. Esther Vidal, Dra. Sylvia Fernandez-Shaw, Dr. Julio Herrero, Dra. Francisca Luceño, Dra. Buenaventura Coroleu.

Comité de Registro SEF, Madrid

Contacto: Dr. Jose A. Castilla, U. Reproducción, HU Virgen de las Nieves 18014 Granada, España.

INTRODUCCIÓN

Las novedades a destacar del registro SEF son: los resultados correspondientes a 2007 y los cambios que van a tener lugar durante la recogida de datos del año 2008.

A.- REGISTRO SEF 2007

Las principales cambios en el registro 2007 se resumen en dos, incremento significativo en el número de centros participantes y ciclos registrados, así como en la ampliación de técnicas de reproducción asistida recogidas.

EVOLUCIÓN DEL NÚMERO DE CENTROS PARTICIPANTES Y ACTIVIDAD REGISTRADA

Han participado un total de 138 centros, lo que supone aproximadamente el 75% de los centros acreditados en España. En 2007 se han registrado un total de 83.454 ciclos de reproducción asistida. Distribuidos de la siguiente manera 54.720 ciclos de FIV/ICSI y técnicas afines, de IAC 22.917 ciclos y de IAD 5.917 ciclos. A lo largo de su existencia el registro TRA SEF ha contabilizado 494.368 ciclos de TRA. Toda esta actividad sitúa en 2007 a España en 3º lugar entre los países europeos con más ciclos de FIV/ICSI y técnicas afines registrados, encabezando la lista Francia y Alemania. España sigue a la cabeza de Europa en donación de ovocitos y DGP.

Se han registrado 382 ciclos de FIV/ICSI y 683 de IAC en parejas serodiscordantes. Se han realizado 28 ciclos de maduración ovocitaria in vitro y se han registrado por primera vez 234 ciclos con ovocitos crioconservados.

PARÁMETROS CLÍNICOS

El porcentaje de pacientes >35 años tratadas con FIV/ICSI es de un 54% en

2007 frente al 50,9% y al 50,8% en 2002 y 2003 respectivamente. El porcentaje de pacientes receptoras de ovocitos >35 años es del 86,5%. La indicación más frecuente de FIV/ICSI fue el factor masculino en 2007 (34,7%)

El porcentaje de ciclos con antagonistas se ha estabilizado en un 35,3% de todos los ciclos de FIV/ICSI. La utilización de ICSI sigue aumentando llegando al 77% de los ciclos de FIV/ICSI realizados en 2007 frente al 68 de 2002.

Accesibilidad: con las limitaciones de un registro voluntario, hemos estimado que en España se realizaron 1241 ciclos de FIV/ICSI y técnicas afines por millón de habitantes. Y los nacidos por estas técnicas en 2007 representaron el 2,9% de todos los recién nacidos en España en 2007. Datos que sitúan a España ligeramente por encima de las medias de los países europeos en estos indicadores.

EFICACIA: TASA DE EMBARAZO

La tasa de embarazo por transferencia ha seguido creciendo en comparación con años anteriores siendo del 39% en FIV/ICSI, 28,3% en criotransferencias y un 50,7% en donación de ovocitos. Estas cifras sitúan a España en los puestos de cabeza del registro europeo en tasas de embarazo.

CALIDAD DE TRA

La evolución en el número de embriones transferidos entre los años 1998 y 2007 demuestra que se ha producido un descenso continuo en las transferencias de más de 3 embriones. La subida de las transferencias de 2 embriones, que ha ido produciéndose claramente desde 1998, también ha continuado en 2007, aunque con menos intensidad. La transferencia de un solo embrión ha ido

aumentando paulatinamente aunque lentamente (Fig 3).

El cambio en la política de transferencia desde 1998 ha hecho que el número de embriones transferidos por cada embarazo sea similar en el registro europeo que en el español (7 vs 5,3 embriones transferidos/embarazo), hecho que en el año 1999 era 7,8 en el registro europeo frente a 10,2 en el registro español.

SEGURIDAD DE TRA

En la evolución de la multiplicidad de los partos se observa un ligero descenso en los partos únicos, a la vez que los partos múltiples experimentan un ascenso (Fig 4). Estos cambios observados en los partos múltiples sugieren que para mantener el descenso en partos múltiples de años anteriores quizá sea necesario la adopción de nuevas medidas científicas (guías de buena práctica) o legislativas. El porcentaje de embarazo múltiple en España sigue siendo superior a la media europea (24% vs 20.5%). El porcentaje de síndrome de hiperestimulación fue menor en el registro español que en el europeo (0.3% vs 1%).

INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

De los 30 países que participan en el registro europeo solo 21 aportan datos sobre IA, siendo España uno de ellos. Como ya se comentó en España en 2007 se realizaron de IAC 22.917 ciclos y de IAD 5.917 ciclos. La tasa de embarazos por inseminación global (IAC+IAD) fue del 15,6%, siendo superior en IAD con un 20,9% que en IAC con un 14,1%. La tasa de embarazo múltiple fue en IAC del 13,8% y en IAD 13,6%. Como vemos la tasa de embarazo múltiple tras IA fue mucho menor que tras IVF/ICSI (13,6% vs 24%).

CONCLUSIONES DEL REGISTRO 2007

El registro TRA SEF se ha consolidado como uno de los registros más activos a nivel europeo. El análisis de datos recogidos ha permitido comprobar como el porcentaje de embarazo por ciclo es de los más altos de Europa y que el porcentaje de embarazo múltiple en España aun no ha alcanzado el nivel europeo. Además, existen varios puntos en la actividad realizada en España que difieren de la actividad registrada en Europa: elevado porcentaje de ICSI frete a FIV, y elevado número de donación de ovocitos y DGP. El estudio de estos datos debe tener siempre presente que en algunos países de nuestro entorno no se realizan estas técnicas por limitaciones legales. Por último, entre los retos futuros que se presentan al Registro TRA SEF se encuentra el aumentar el porcentaje de participación, el registro de ciclos realizados a parejas procedentes de otros países (cross-border reproductive care), el registro y seguimiento de los partos y recién nacidos por TRA y la colaboración con las autoridades sanitarias para el desarrollo del registro de actividad previsto en la legislación vigente.

B.- REGISTRO SEF 2008

Desde un punto de vista logístico, el Registro del año 2008 se presenta con grandes cambios, fruto de la colaboración entre la SEF y el Ministerio de Sanidad y Política Social, y que supone que el Ministerio de Sanidad y Política Social considera útil el registro de la SEF mientras se redacta el Real Decreto que desarrollará el registro oficial. El Ministerio de Sanidad y Política Social facilitará el acceso a los pacientes al informe anual del Registro SEF 2008.

Este nuevo escenario conlleva algunos cambios. El primero a nivel de financiación, pues el Ministerio financiará parte del registro SEF 2008, siendo el resto financiado por Schering-Plough. En segundo lugar, la instauración de un procedimiento de monitorización de datos. Estas monitorizaciones, además de ser muy bien valoradas por el Ministerio de Sanidad y Política Social, son una petición reiterada desde el registro europeo (EIM) y se consideran un paso adelante por todos los miembros del comité de registro de la SEF, que

aportaran credibilidad y fiabilidad a nuestro registro. Dicha monitorización será realizada por Dynamic Solutions (la misma consultora que desarrolla y explota la base de datos del registro) mediante visitas presenciales de un día. Estas validaciones se realizarán al 10% de los centros participantes escogidos al azar. En tercer lugar, se pondrá a disposición de los pacientes y del Ministerio de Sanidad y Política Social además de la memoria habitual con los datos de todos los centros agregados, los datos (tasas de embarazo, número de embriones transferidos, embarazos múltiples, etc) de los centros participantes individualizados (centro por centro). Este cambio es el que hace que denominemos a esta nueva etapa como de "transparencia". Y en último lugar, a nivel de base datos este año introducimos las siguientes novedades: Se solicita información sobre parejas atendidas no residentes en España y el número de ovocitos criopreservados. Esperamos que todos estos cambios sirvan para aumentar la utilidad del registro tanto a pacientes, como a profesionales y autoridades sanitarias.

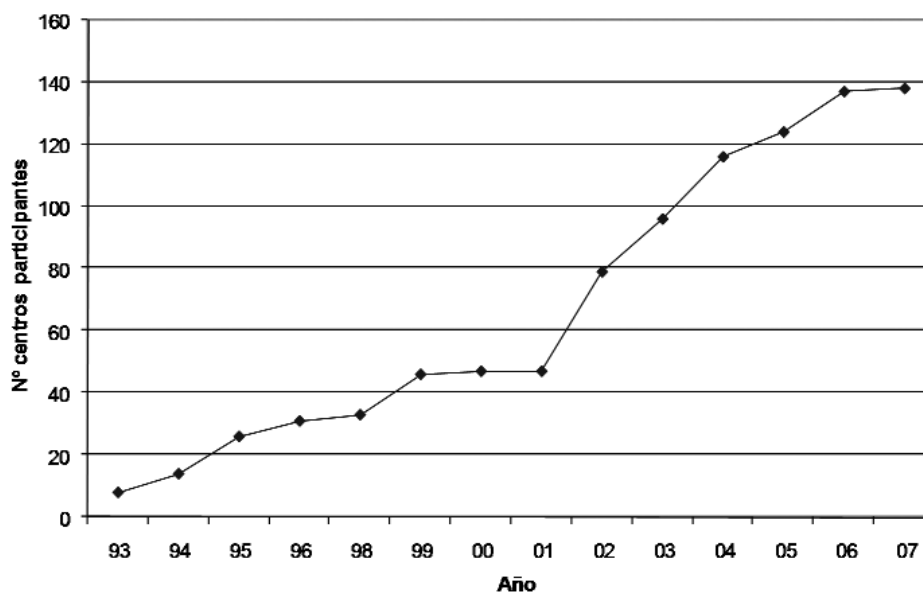


Fig 1. Evolución del número de centros participantes en el Registro TRA SEF.

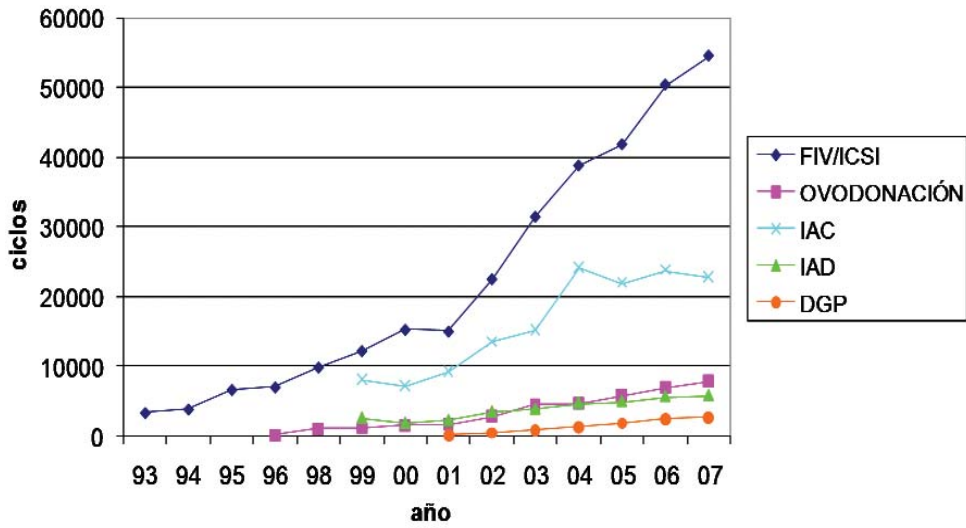


Fig 2. Ciclos analizados en el Registro TRA SEF según técnica

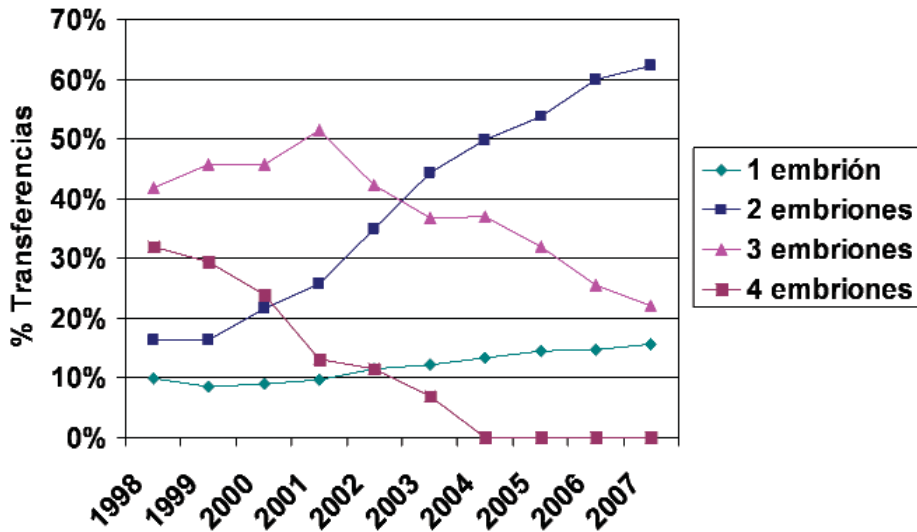


Fig 3. Evolución de la política del número de embriones a transferir

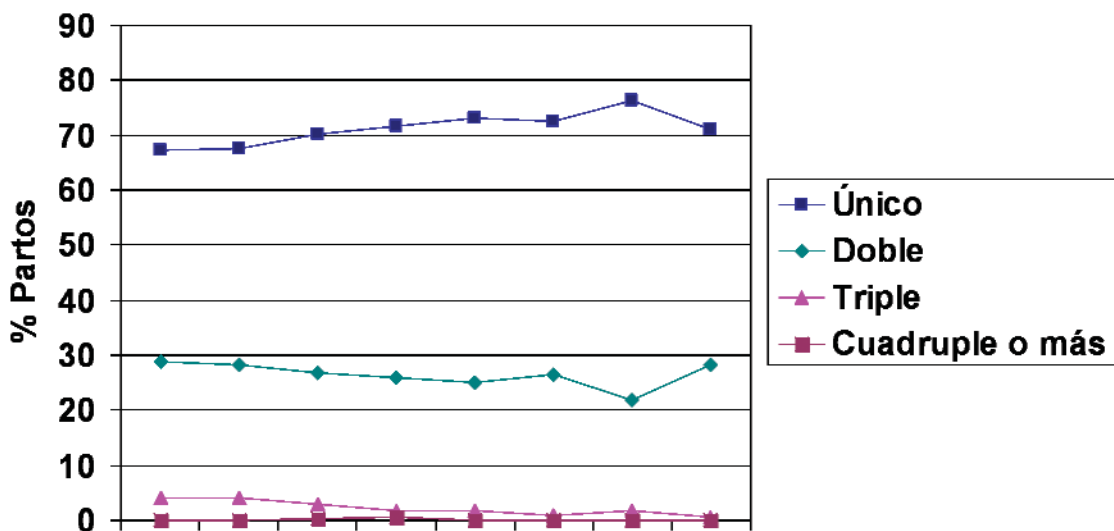


Fig 4. Evolución de la multiplicidad de los partos

Medio único



Quermed,s.a.



HTF - HTF Hepes - Aceite - Gradientes - PVP - PGD - Acido Tirodes - Hialorunidas

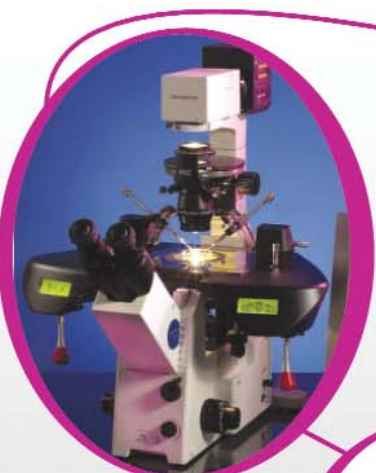
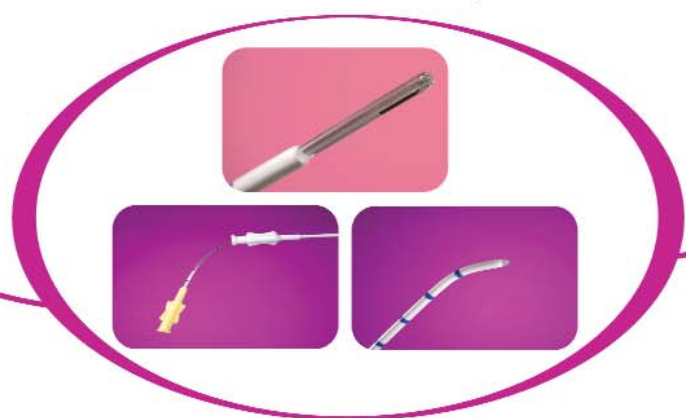
Global para Cultivo - Global para Fertilizar - Global con Hepes



Pipetas ICSI

Catéter de Transferencia Ecogénico

Agujas de punción OPS



Micromanipulador

Termometro FIV

Monitor Volátiles

Medidor de PH

Centrifuga FIV

Placas Calefactadas

Baño en seco

Selladora por ultrasonidos

REQUISITOS DEL LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA CLÍNICA: IMPLICACIONES DE LA TRANSPOSICIÓN DE LAS DIRECTIVAS EUROPEAS

M. Cristina Magli, Luca Gianaroli, Anna P. Ferraretti
SISMER, Reproductive Medicine Unit, Bologna, Italy

INTRODUCTION

In March 2004, the European Parliament issued the Directive 2004/23/EC 'On setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage, and distribution of human tissues and cells'. This is a legal document originating from the European Union's public health programme, known as the European Union Tissues and Cells Directive (EUTCD).

The Directive applies to human tissues and cells, including fresh or frozen reproductive cells for application to the human body, meaning that ART laboratories are covered by this directive. The directive is basically concerned with increasing quality and safety in application of human tissues and cells to the human body and anticipates common standards whose basic requirements were laid down in the "mother" Directive 2004/23/EC and two subsequent Technical Directives 2006/17/EC and 2006/86/EC.

THE EUTCD IN ART LABORATORIES: WHY?

The application of the directive in ART is especially focussed on minimizing the risk of two severe adverse events, namely 1) transmission of infections from one sample to the other (cross-contamination) or to the operators, and 2) prevention of gamete/embryo exchange (mix-up). In order to do so, the directive promotes quality by imposing a comprehensive quality management system in ART laboratories (called as tissue establishments). This implies a policy of quality control and quality assurance at all units having adequately trained and certified staff, full documentation and formulation of standard operating procedures.

There is no doubt that EUTCD will have a profound impact on units performing

ART. All tissue establishments will have not only to be licensed or accredited on the basis of the national authorities, but they must also implement a quality management system and ensure complete documentation of all conducted activities, including full traceability for all records and materials used in each treatment.

ESHRE, the European Society for Human Reproduction and Embryology, has given full support and guidance to professionals working in ART laboratories by formulating the 'Guidelines for good practice in IVF laboratories'. This document represents, in the current revised version, a complement to the requirements issued by the EUTCD. It constitutes the minimal requirements for any laboratory offering ART and contains relevant information for embryologists who, in their daily practice, have the responsibility for the correct and justified application of ART in the laboratory,

IMPLEMENTATION OF THE DIRECTIVE.

The EUTCD has to be interpreted and implemented through national authorities in each individual country. This means that depending on the national interpretation, the directive may be implemented differently in the different European member states. In addition, the national implementation is subject to national regulations that possibly are already in place in each member state.

POINTS OF GENERAL AGREEMENT

The directive applies to fresh and cryopreserved gametes, pronuclear stages, embryos, ovarian and testicular tissues that are being processed, cultured, banked or stored. Practically speaking, the term 'direct use' does not apply to current ART procedures where

all samples are processed, including the case of intrauterine insemination. Germany is the only exception to this point, as they consider embryos not covered by the directive,

Each ART unit has to put in place and update a quality management system based on the principles of good practice with the specific aim of preventing the transmission of infectious disease and avoiding misidentification or mix-up of gametes or embryos.

Biological testing of the donor is necessary whenever the donated cells will be processed, cultured, banked or stored. Required tests are: HIV 1-2, Hepatitis B surface Antigen, Hepatitis B Core antibodies and Hepatitis C antibodies. In the case of non-partner donation, additional screening for syphilis and Chlamydia is required, as well as the genetic screening for recessive diseases known to be prevalent in the ethnic background. The implementation of viral screening for all ART patients makes it possible to have an objective distinction between infected and non-infected patients. Positivity for HIV or Hepatitis does not automatically exclude patients from treatments, and national authorities should clearly define how and where viral positive patients should be treated.

Cells and tissues have to be traceable from donor to recipient and vice versa. Traceability is also mandatory for all products and critical materials coming into contact with tissues and cells, including culture media, supplements and disposables.

A unique European coding will be proposed for non-partner donation, whereas it has been established that partner donation traceability is guaranteed by a code that is unique within the clinic.

In ART every misidentification or mix-up of gametes or embryos is to be considered a serious adverse event or reaction.

POINTS OF NON-AGREEMENT

Some other points in the EUTCD are still debatable with significant diversities of interpretation given by the member states.

This regards particularly some matters in the directive that are problematic for the ART methodology due to the wide coverage of the directive in comparison to the specificity of ART, in which the same patient can perform repeated procedures whose duration is relatively long.

The screening for viral infections should be done at the "time of donation", but no specification is given regarding the need for re-testing patients prior to each treatment or whether a specified interval is tolerable. The interpretation of the member states are quite different, both regarding the time of donation (especially in the case of oocyte pick-up for partner donation) and the validity of the exams (ranging between 6 and 24 months). ESHRE suggests testing patients for partner donation no more than 30 days before starting the initial

treatment with validity, if the test is negative, of at least 24 months. If the test is positive, the couple is considered to be positive in all future treatments. There is no doubt that the frequency of testing will have a profound financial impact on the directive implementation.

The directive establishes that the air quality should be a GMP defined Grade A on a background air quality of Grade D unless a less stringent air quality may be justified according to a series of provisions listed in the document. Also in this case the interpretation of the different member states varies with some states having no specific air quality requirements, while others have requirements as strict as those in clean rooms for pharmaceutical production. The decision of not requiring specific air condition is substantiated by the consideration that ART have been performed in Europe for more than 20 years with no documented evidence of transmission of viral infections (hepatitis/HIV etc) due to the air quality in the laboratory. In addition, the systematic screening of ART patients prior to treatment will greatly decrease any potential risk by enabling to handle infectious patients in a dedicated environment.

Based on these observations, ESHRE considers assisted reproduction to be covered by the exceptions listed in the EUTCD as to air quality requirements.

Inspections by the national authority have started in a very few member states. The great majority of regulators are experienced in non-ART tissue establishments and this makes it difficult for them to understand why different conditions and situations are characterized in ART laboratories.

CONCLUSIONS

This lack of harmonisation leads to confusion and frustration among ART professionals and regulators, but there is no doubt as to the fact that the implementation of the EUTCD will cause a profound change in the mode of performing assisted reproduction. The member states where a constructive dialogue between professionals and regulators has been set up from the beginning of the EUTCD implementation demonstrated that this is possibly the best way of working in the respect of national and European regulations, as well as of the very nature of ART.

MANEJO DE PACIENTES CON ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN EL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA. ¿REPRESENTA REALMENTE UN RIESGO EN EL LABORATORIO?

Fernando Marina, Ruth Alcolea y Simón Marina

Instituto de Reproducción CEFER. Barcelona. Marquesa de Vilallonga, 12. Desp. 21 08017 Barcelona.

E-mail: info@institutocefer.com. www.institutocefer.com

RESUMEN

La presencia de pacientes con enfermedades infecciosas en los laboratorios de reproducción asistida requiere que dichos laboratorios adapten sus protocolos para utilizar técnicas de lavado seminal avaladas y procedimientos clínicos de actuación en caso de mujeres seropositivas. El riesgo que los laboratorios asumen deben ir encaminados a prevenir la transmisión horizontal y vertical en los pacientes que acceden a las técnicas de reproducción asistida, a prevenir que el material biológico de otros pacientes que cohabiten en el laboratorio no se contamine y a velar por la seguridad del personal del laboratorio.

INTRODUCCIÓN

La experiencia acumulada de más de 15 años trabajando en el laboratorio de reproducción asistida con pacientes portadores de enfermedades infecciosas

nos ha obligado a introducirnos en un campo de la biología y la medicina ajeno al que estamos acostumbrados. Una vez conocida la experiencia del doctor Semprini (Semprini et al, 1992) en 1994 decidimos empezar a aplicar técnicas de

lavado seminal y dejar de emplear semen de banco para tratar a mujeres con parejas infectadas por el VIH (virus de la inmunodeficiencia humana). Esta experiencia ha sido publicada en varios trabajos (Marina, 1998; Marina et al.,

1998; Marina et al., 1998a; Alcolea et al., 2006) y refrendada por otros autores (Bujan et al., 2007). En aquel momento fue una apuesta pionera, no exenta de riesgos. Tuvimos que adquirir conocimientos sobre el estudio y tratamiento de enfermedades infecciosas; sobre los mecanismos de detección y transmisión; sobre la manera más eficiente de eliminar el riesgo de contagio y sobre cómo garantizar la seguridad del personal que tenía que trabajar con este tipo de muestras y no tenía la formación adecuada para ello. Aunque en la mayoría de las ocasiones nos referimos al VIH, las actuaciones en el laboratorio frente a otros virus como el VHC o el VHB suelen ser similares. Queremos en este trabajo aportar nuestro conocimiento y experiencia para ayudar a los laboratorios que quieren tratar con este tipo de muestras.

PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

La experiencia de CEFER está basada en dos Protocolos de investigación clínica aprobados por el Comité Ético y de Investigación. El primer protocolo de investigación concluyó que la práctica de los lavados seminales en pacientes portadores del VIH es una técnica segura y que reduce el riesgo de contagio en los pacientes con deseo reproductivo respecto al coito. En un segundo protocolo se establecen las actuaciones encaminadas a tratar con técnicas de reproducción a mujeres portadoras de enfermedades infecciosas para reducir el riesgo de transmisión vertical y el riesgo de contagio a la pareja. Es necesario afirmar que en ningún momento de los protocolos se habla de eliminar por completo el riesgo de contagio, sino de reducirlo al máximo y así consta en los consentimientos informados. Estos protocolos estaban básicamente encaminados a aportar seguridad a los pacientes. Posteriormente, con la aparición del Real Decreto 664/1997 Sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo, se implementaron medidas para mejorar la seguridad del trabajador.

LEGISLACIÓN

El problema del SIDA y la Reproducción es un tema sensible para la Sociedad y por ende para la Autoridad Sanitaria. Lo mismo ocurre aunque en menor medida con otras enfermedades infecciosas.

La actuación médica tendente a que una pareja serodiscordante tenga un hijo puede comportar aspectos éticos y aspectos legales. Los posibles reparos éticos que se pueden aducir los podemos resumir en cuatro:

Riesgo que la mujer inseminada se contagie del virus del SIDA. Bajo la experiencia acumulada en nuestro centro, el riesgo es mínimo, y en todo caso inferior al riesgo de contagio con un coito sin preservativo.

Se crean falsas expectativas en estas parejas. El impreso del Consentimiento Informado que la pareja ha de conocer y firmar informa veraz y objetivamente sobre el tema.

Existen claras expectativas de que la pareja consiga un hijo sin que se contagie la mujer y por tanto tampoco el hijo

Se comenta que, dada la sobrevivencia previsiblemente menor de los hombres seropositivos, se estaría contribuyendo a que viniesen hijos que quedarían huérfanos.

Ante este punto de vista hemos de recordar:

a) que ya la primera Ley de Reproducción Asistida (Ley 35/1988) admitía la inseminación artificial en mujeres sin pareja masculina (artículo 6.1). Este punto no ha cambiado en la nueva Ley 45/2006 (artículo 6.1). Inevitablemente ese niño nacido será en la práctica equiparable al huérfano de padre.

b) La citada Ley 45/2006 permite la inseminación con semen congelado del marido ya fallecido por lo que, antes de ser concebido, ya es huérfano (artículo 9.2).

Estas dos situaciones admitidas y recogidas por la Ley 45/2006 son más drásticas que la situación de la pareja serodiscordante en la que el hombre es seropositivo sano. Los avances en el

tratamiento del SIDA están claramente alargando la sobrevivencia de estos pacientes.

Existe riesgo de contagio para el personal que trabaja en reproducción asistida y no tiene la formación específica. Existe también el riesgo que se contamine material biológico de otros pacientes presentes en el laboratorio.

En el Real Decreto 664/1997 y la Directiva Europea 90/679/CEE, se definen las medidas a adoptar para el manejo de muestras infecciosas. El Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, a través del Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, desarrolla este Real Decreto en una Guía Técnica Para la Evaluación y Prevención de los Riesgos Relacionados con la Exposición a Agentes Biológicos. Castilla y Magán (2003) profundizan en esta legislación para su implantación en los laboratorios de reproducción asistida.

EVALUACIÓN DEL RIESGO

Como hemos comentado en el apartado anterior, en el RD 664/1997 se definen los riesgos, las obligaciones y las indicaciones necesarias para poder trabajar en nuestros laboratorios con agentes biológicos potencialmente infecciosos. En la Guía Técnica elaborada por el Instituto Nacional de Seguridad en el Trabajo, se desarrolla este RD 664/1997.

Según establece el RD 664/1997 en su artículo 2, los agentes biológicos son clasificados, en función del riesgo de infección, en cuatro grupos (Tabla I)

Siguiendo esta misma clasificación, en el anexo II de dicho Real Decreto se asignan a cada grupo los diferentes agentes biológicos. En la Tabla II se muestra la clasificación de los principales virus que tratamos. Dicha clasificación de riesgo se ha realizado considerando sus posibles efectos sobre trabajadores sanos. No se ha tenido en cuenta los efectos particulares que puedan tener en trabajadores cuya sensibilidad se vea afectada por causas tales como patología previa, medicación, trastornos inmunitarios, embarazo o lactancia.

El anexo IV del RD 664/1997 define las indicaciones relativas a las medidas de contención y a los niveles de contención (ver Tabla III)

En la Tabla IV se hace referencia a los niveles de contención aplicables a los procedimientos empleados en los laboratorios y a los virus que tratamos en este trabajo según la Nota Técnica de Prevención NTP 520 elaborada por el Centro Nacional de Condiciones de Trabajo. Según esta tabla, en caso de riesgo de producción de salpicaduras y aerosoles es necesario aplicar un nivel de contención 3. En ningún momento, con los virus que solemos tratar, es necesaria la aplicación de un nivel de contención 4.

OBLIGACIONES DEL RESPONSABLE DEL LABORATORIO

Según el Real Decreto 664/1997 en su Artículo 4 se establece que es obligación del responsable del laboratorio realizar una evaluación de los agentes biológicos, determinando la naturaleza, el grado y duración de la exposición de los trabajadores. Esta evaluación ha de ser periódica y, en cualquier caso, cada vez que se produzca un cambio en las condiciones que pueda afectar a la exposición de los trabajadores a agentes biológicos. Además, se procederá a una nueva evolución del riesgo cuando se haya detectado en algún trabajador una infección o enfermedad que se sospeche que sea consecuencia de una exposición a agentes biológicos en el trabajo

REDUCCIÓN DE RIESGOS

En el Artículo 6 del RD 664/1997 se definen las actuaciones encaminadas a reducir el riesgo para la seguridad de los trabajadores. Estas actuaciones se resumen en 9 puntos:

Establecer procedimientos de trabajo adecuados

Reducir, al mínimo posible, el número de trabajadores que estén o puedan estar expuestos

Adopción de medidas de seguridad para la recepción, manipulación y transporte dentro del lugar de trabajo

Adopción de medidas de protección colectiva o, en su defecto, de protección individual, cuando la exposición no pueda evitarse por otros medios

Medidas seguras de recogida, almacenamiento y evacuación de residuos

Medidas de higiene para evitar o dificultar la dispersión del agente fuera del lugar de trabajo.

Utilización de señal de peligro biológico.

Establecimiento de planes para hacer frente a accidentes de los que puedan derivarse exposiciones a agentes biológicos.

Verificación, cuando sea necesario y teóricamente posible, de la presencia de los agentes biológicos utilizados en el trabajo fuera del confinamiento físico primario.

MEDIDAS HIGIÉNICAS

El Artículo 7 del RD 664/1997 define las medidas higiénicas que se deben adoptar en las actividades en las que exista riesgo para la seguridad de los trabajadores. Estas medidas consisten en 5 puntos:

Prohibir que los trabajadores coman, beban o fumen en las zonas de trabajo

Proveer a los trabajadores de prendas de protección apropiadas o de otro tipo de prendas especiales adecuadas

Disponer de retretes y cuartos de aseo apropiados y adecuados para uso de los trabajadores, que incluyan productos para la limpieza ocular y antisépticos para la piel.

Disponer de un lugar para el almacenamiento de los equipos de protección.

Especificar los procedimientos de obtención, manipulación y procesamiento de muestras de origen humano o animal.

PROCEDIMIENTOS DE TRABAJO RECOMENDADOS

Desarrollando los dos apartados anteriores y desde el punto de vista de la seguridad y las buenas prácticas en el laboratorio referentes a la exposición a agentes biológicos y según la Nota Técnica de Prevención NTP 376 elaborada por el Centro Nacional de Condiciones de Trabajo, se establecen las siguientes recomendaciones:

Nunca se pipeteará con la boca, empleándose los dispositivos de tipo mecánico.

Deben utilizarse guantes adecuados en todos los trabajos que entrañen algún contacto con sangre o material infeccioso.

Hay que utilizar batas o uniformes de trabajo para evitar la contaminación de los vestidos de calle. No se utilizará la ropa de laboratorio fuera de éste (cafetería, biblioteca, etc.)

Siempre que haya peligro de salpicaduras se utilizarán gafas de seguridad, pantallas faciales u otros dispositivos de protección.

A fin de evitar cortes accidentales, se preferirá el uso de material plástico al de cristal

En la zona del laboratorio no se permitirá comer, guardar alimentos, beber, fumar ni usar cosméticos.

El uso de agujas hipodérmicas y de jeringas debe evitarse. Cuando ello no sea posible, las agujas se recogerán en recipientes adecuados que eviten los pinchazos accidentales

Las superficies de trabajo se descontaminarán por lo menos una vez al día y siempre que haya un derrame. Una nota debe especificar el modo de empleo de desinfectantes, la naturaleza del desinfectante a utilizar y su concentración

Todos los desechos biológicos, ya sean líquidos o sólidos tienen que ser descontaminados antes de su eliminación y se seguirán las normas existentes sobre la gestión de residuos sanitarios

Todo el personal se lavará las manos

después de haber manipulado material infeccioso, así como al abandonar el laboratorio

El acceso al laboratorio debe ser controlado

El material contaminado, que deba ser descontaminado en un lugar exterior al laboratorio, se colocará en un contenedor especial, y se cerrará antes de sacarlo del laboratorio

Deberá existir un programa de lucha contra insectos y roedores que se pondrá en práctica.

DOCUMENTACIÓN

Es obligación del responsable del laboratorio de disponer de la siguiente documentación (artículo 9, RD 664/1997):

Resultados de la evaluación de los agentes biológicos (artículo 4)

Lista de trabajadores expuestos en la empresa a agentes biológicos de los grupos 3 y 4.

INFORMACIÓN Y FORMACIÓN DE LOS TRABAJADORES

En el artículo 12 del RD 664/1997 obliga al responsable del laboratorio a tomar las medidas apropiadas para garantizar que los trabajadores reciban la formación suficiente y adecuada, en particular en forma de instrucciones, en relación con:

Los riesgos potenciales contra la salud

Las precauciones que deben tomar para prevenir la exposición

Las disposiciones en materia de higiene

La utilización de equipos de protección individual

Medidas en caso de accidente

EQUIPOS DE PROTECCIÓN INDIVIDUAL

En el Real Decreto 773/97 se definen y clasifican los equipos de protección individual (EPI) y se establecen las obligaciones que deben cumplir tanto

los trabajadores como los responsables del Laboratorio.

CABINAS DE SEGURIDAD BIOLÓGICA

No hay que confundir las Cabinas de Seguridad Biológica (CSB) con las cabinas de flujo laminar horizontal o vertical. El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta (CDC) define y clasifica este tipo de cabinas (ver Tabla V). Para el manejo de los virus que tratamos, en la mayoría de los casos es suficiente el empleo de EPI. Sólo sería aconsejable la utilización de CSB de tipo II en el caso de laboratorios que manejen un gran volumen de este tipo de muestras. Sería obligatorio su uso en caso que se quiera concentrar o cultivar el agente biológico.

CONDUCTA A SEGUIR ANTE UN ACCIDENTE LABORAL CON EXPOSICIÓN A SANGRE Y FLUIDOS CORPORALES CONTAMINADOS

Según la Nota Técnica Preventiva NTP 398 elaborada por el Centro Nacional de Condiciones de Trabajo la actuación en caso de accidente se resume en tres acciones con el siguiente orden:

Limpieza de la herida. Inmediatamente después de producirse el contacto accidental con sangre u otros fluidos hay que quitarse los guantes y lavarse cuidadosamente la herida con iodóforos (p.e. Povidona iodada). En personas alérgicas al yodo se puede emplear la cloramina.

Comunicación al Servicio de Prevención. Todo accidente con sangre y sus derivados debe ser comunicado al Servicio de Prevención e inmediatamente se realizará una ficha epidemiológica para conocer los datos relacionados con el accidente (nombre, edad, categoría profesional, lugar del accidente, hora en que ocurrió, mecanismo de producción, localización y naturaleza de la lesión, etc.)

Estudio inmunológico del individuo accidentado. Cuando pueda identificarse la fuente, previo consentimiento y tras haber sido informado, se procederá a extracción sanguínea para determinar los anticuerpos frente al antígeno del núcleo o core (AntiHB-core) total, frente

al VHC y los anticuerpos frente al VIH. Según la naturaleza de la "fuente" se procederá a la quimioprofilaxis y seguimiento adecuado a cada caso según la siguiente figura tomada del "Manual de protección frente a Riesgos Biológicos" del Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (Figura 1)

RECOMENDACIONES ASEBIR

Las siguientes recomendaciones son copia de la revisión que se hizo en 2007 del 1er Cuaderno de Embriología Clínica "Recomendaciones sobre Recursos Humanos y Físicos para el Laboratorio de Reproducción Asistida Humana" editado por ASEBIR. En dicho cuaderno existe un apartado específico para estos pacientes titulado: "PROCESADO DE MUESTRAS DE PACIENTES CON ENFERMEDADES INFECCIOSAS TRANSMISIBLES" y que a continuación transcribimos:

"Al contrario que en otros laboratorios clínicos (microbiología, análisis, inmunología, etc), donde las muestras biológicas tras su uso son desechadas, gran parte del material biológico que se maneja en el laboratorio de reproducción es para uso clínico. Esto obliga a tomar medidas de seguridad específicas a la hora de manejar muestras de pacientes con enfermedades infecciosas transmisibles. Estas medidas tienen por objeto no sólo la protección de los trabajadores, sino la eliminación (en la medida de lo posible) de la contaminación cruzada entre pacientes, la transmisión vertical y el contagio entre ambos miembros de la pareja. Dentro de los aspectos a tener en cuenta en la atención a los deseos reproductivos de estos pacientes se encuentran:

Debe realizarse por equipos multidisciplinares de profesionales que engloben entre otros microbiólogos, y clínicos especialistas en enfermedades infecciosas.

El riesgo de transmisión de la enfermedad se minimiza mediante las técnicas de reproducción asistida pero no se anula

Debe existir una separación temporal entre el material biológico de estos pacientes y el resto de pacientes.

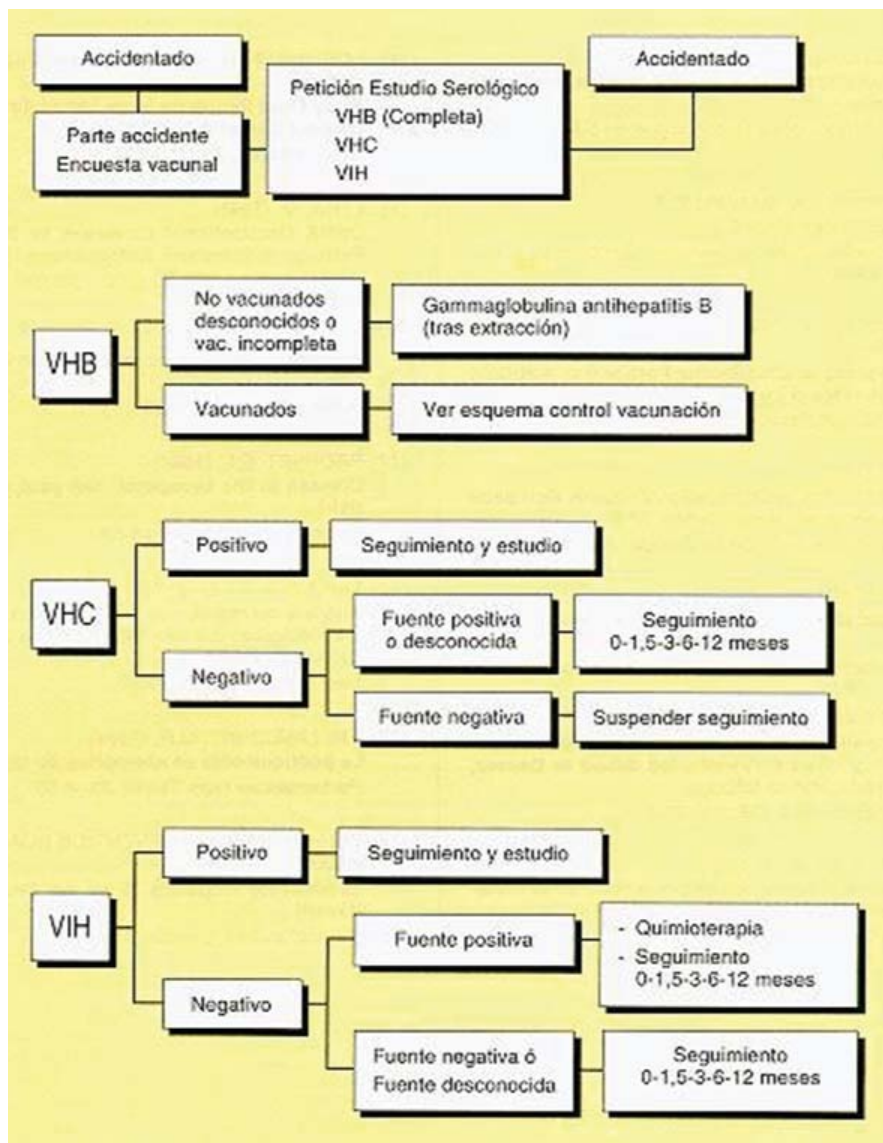


Tabla I. Grupos de riesgo de los agentes biológicos

Todos los equipos pueden ser compartidos por estos pacientes en tiempos diferentes, excepto las bombonas de almacenamiento de nitrógeno líquido, que deben ser de uso exclusivo para estos pacientes. En el caso de los incubadores se recomienda que sean de uso exclusivo, pero si no existe otra opción se pueden destinar las últimas bandejas de las mismas para el uso de estos pacientes.

Las punciones de estos pacientes deben realizarse en último lugar de la lista de trabajo diaria.

La limpieza de los aparatos que se compartan con otros pacientes (Campana de flujo laminar vertical, microscopios, etc) debe ser especialmente cuidadosa para garantizar la eliminación de los virus. Se

recomienda el uso de desinfectantes oxidativos que no contengan alcohol (cloro activo a muy baja concentración, dióxido de cloro, ozono, peróxido de hidrógeno...).

Para la protección del personal se recomiendan equipos de protección biológica individual (utilizar gafas, mascarillas, dobles guantes, etc)

Se deben evitar los pipeteos con la boca y los instrumentos cortantes

En el caso de varones seropositivos se recomienda una técnica de lavado de semen validada que garantice la no detección del virus.

En el caso de mujeres seropositivas se recomiendan lavados de los ovocitos más exhaustivos.

En el caso de congelar embriones en este tipo de pacientes se recomienda el uso de pajuelas de seguridad biológica. También podría ser eficaz el uso de tanques de nitrógeno secos o la utilización de contenedores de nitrógeno independientes."

CONCLUSIONES

La correcta utilización de los EPI frente al riesgo biológico como herramienta complementaria a las medidas generales de tipo higiénico, es aun hoy en día una asignatura pendiente. Sin embargo, con el descubrimiento en los años 80 del virus de la inmunodeficiencia humana, el personal sanitario empezó a tener conciencia del riesgo profesional que supone la exposición a determinados agentes biológicos. Este hecho fue el detonante para que la cultura preventiva frente al riesgo biológico cambiara y en consecuencia se empezaron a utilizar protecciones personales adecuadas y procedimientos de contención adecuados. En el laboratorio de reproducción asistida no esta generalizada esta cultura y esperamos que las indicaciones que se muestran en éste trabajo arrojen luz sobre los requisitos y maneras de actuar para poder tratar a pacientes portadores de enfermedades infecciosas en nuestros laboratorios.

Es de suma importancia que se tengan en cuenta estas medidas antes de empezar a trabajar con pacientes portadores de enfermedades infecciosas. Aplicando estas medidas hemos conseguido, hasta la fecha, que ninguna mujer, ni hombre, ni niño, ni trabajador se contagie de ninguno de los virus tratados. Aunque las probabilidades de contagio son bajas, aún sin tener en cuenta muchas de estas medidas, las consecuencias de un solo contagio pueden ser catastróficas para un centro de reproducción. Es por esto que recomendamos que todo centro de reproducción asistida esté informado de todos los aspectos referentes a la seguridad del laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

I Cuaderno de Embriología Clínica "Recomendaciones sobre Recursos Humanos y Físicos para el Laboratorio de

Reproducción Asistida Humana". ASEBIR 2007

Alcolea, R., Marina, F., Suñol, J. et al. Twelve years' experience in assisted reproduction with HIV-1-seropositive men. *Huma. Reprod.* 2006, 21 Supplement 1:i96-i97

Bujan L, Hollander L, Coudert M, et al.; CREAThE network. Safety and efficacy of sperm washing in HIV-1-serodiscordant couples where the male is infected: results from the European CREAThE network. *AIDS.* 2007 Sep 12;21(14):1909-14.

CDC/NIH. U.S. Primary Containment For Biohazards. Selection, Installation and Use of Biological Safety Cabinets. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Washington. 1995

http://www.cdc.gov/OD/OHS/biosfty/primary_containment_for_biohazards.pdf
Directiva Europea 90/679/CEE. Directiva del Consejo sobre la protección de los trabajadores contra riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. *Diario Oficial de Comunidades Europeas*, 1990

Castilla J.A, Magán, R. Seguridad Biológica en el Laboratorio de Reproducción Asistida. Aula de Formación en Embriología Clínica. Nº 4. Gráficas Fernando. 2003

Guía Técnica Para la Evaluación y Prevención de los Riesgos Relacionados con la Exposición a Agentes Biológicos. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. ISBN: 84-7425-577-5

Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Notas Técnicas de Prevención (376, 398, 520). Barcelona 1998

Marina, S. Infection and male infertility. In: Whitfield, H.N., Hendry, W.F., Kirby, R.S. & Duckett, J.W. (eds) *Textbook of genitourinary surgery*. Volume 2. Blackwell Science, Oxford, UK, pp 1441-1455, 1998

Marina, S., Marina, F., Alcolea, R. et al. Human immunodeficiency virus type 1-serodiscordant couples can bear healthy children after undergoing intrauterine insemination. *Fertil. Steril.* 1998, 70:351-359

Marina, S., Marina, F., Alcolea, R. et al. Case Report: Pregnancy following

intracytoplasmic sperm injection from an HIV-1-seropositive man. *Hum. Reprod.* 1998a, 13: 3247-3249

Real Decreto 664/1997 de 12.5 (BOE 24.5.1997) Sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo

Real Decreto 773/1997 de 30.5 (BOE 12.6.1997) Disposiciones mínimas de seguridad y de salud relativas a la utilización por los trabajadores de equipos de protección individual

Semprini, A., Levy-Setti, P., Bozzo, M., Ravizza, M., Taglioretti, A., Sulpizio, P., Albani, E., Oneta, M. & Pardi, G. Insemination of HIV-negative women with processed semen of HIV-positive partners. *Lancet*, 1992, 340:1317-1319.

Grupo	Definición
1	Aquel que resulta poco probable que cause una enfermedad en el hombre
2	Aquel que puede causar una enfermedad en el hombre y puede suponer un peligro para los trabajadores, siendo poco probable que se propague a la colectividad y existiendo generalmente profilaxis o tratamiento eficaz
3	Aquel que puede causar una enfermedad grave en el hombre y presenta un riesgo de que se propague a la colectividad y existiendo generalmente una profilaxis o tratamiento eficaz
4	Aquel que causando una enfermedad grave en el hombre supone un serio peligro para los trabajadores, con muchas probabilidades de que se propague a la colectividad y sin que exista generalmente una profilaxis o un tratamiento eficaz

Tabla II. Clasificación de los agentes biológicos

Agente biológico	Grupo	Anotaciones
Virus de (VHB)	3	Vacuna eficaz posible. Normalmente no infeccioso a través del aire. La lista de trabajadores expuestos al agente debe conservarse durante más de diez años después de la última exposición.
Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)	3	Normalmente no infeccioso a través del aire. La lista de trabajadores expuestos al agente debe conservarse durante más de diez años después de la última exposición.
Virus de (VHC)	3	Normalmente no infeccioso a través del aire. La lista de trabajadores expuestos al agente debe conservarse durante más de diez años después de la última exposición.

Tabla III. Indicaciones relativas a las medidas de contención y a los niveles de contención

	Medidas de contención	Nivel de contención		
		2	3	4
1	El lugar de trabajo se encontrará separado de toda actividad que se desarrolle en el mismo edificio	No	Aconsejable	Si
2	El aire introducido y extraído del lugar de trabajo se filtrará mediante la utilización de filtros de alta eficacia para partículas en el aire (HEPA) o de forma similar	No	Si, para la salida de aire	Si, para la entrada y salida de aire
3	Solamente se permitirá el acceso al personal designado	Aconsejable	Si	Si, con exclusión de aire
4	El lugar de trabajo deberá poder cerrarse para permitir su desinfección	No	Aconsejable	Si
5	Procedimiento de desinfección especificados	Si	Si	Si
6	El lugar de trabajo se mantendrá con una presión negativa respecto a la presión atmosférica	No	Aconsejable	Si
7	Control eficiente de vectores, por ejemplo, de roedores e insectos	Aconsejable	Si	Si
8	Superficies impermeables al agua y de fácil limpieza	Si, para el banco de pruebas o mesa de trabajo y el suelo	Si, para el banco de pruebas o mesa de trabajo y el suelo	Si, para el banco de pruebas o mesa de trabajo, el suelo, las paredes y los techos
9	Superficies resistentes a ácidos, álcalis, disolventes y desinfectantes	Aconsejable	Si	Si
10	Almacenamiento de seguridad para agentes biológicos	Si	Si	Si, almacenamiento seguro
11	Se instalará una ventanilla de observación o un dispositivo alternativo en las zonas de manera que se pueda ver a sus ocupantes	Aconsejable	Aconsejable	Si
12	Laboratorio con equipo propio	No	Aconsejable	Si
13	El material infectado, animales incluidos, deberá manejarse en una cabina de seguridad biológica o en un aislador u otra contención apropiada	Cuando proceda	Si, cuando la infección se propague por el aire	Si
14	Incinerador para destrucción de animales muertos	Aconsejable	Si (disponible)	Si, en el mismo lugar

Tabla IV. Niveles de contención aplicables a diferentes virus

Agente biológico	Peligros en el laboratorio	Precauciones recomendadas
Virus de (VHB)	Presente en sangre y componentes de la misma y en otros líquidos biológicos como orina, semen, líquido cefalorraquídeo y saliva. Las vías de exposición pueden ser por inoculación parenteral y exposición de la piel y de las mucosas a la sangre y a los distintos fluidos corporales de los pacientes. El virus permanece estable durante varios días en la sangre seca y sus componentes.	Nivel de contención 2 para las actividades que impliquen la manipulación de tejidos y fluidos corporales potencialmente infectados Nivel de contención 3 y precauciones del personal para las actividades con un elevado potencial de producción de salpicaduras y aerosoles y en la producción de grandes cantidades de elevadas concentraciones Se recomienda vacunar al personal expuesto
Virus de (VHC)	Se detecta principalmente en la sangre y suero sanguíneo, con menor frecuencia en la saliva y muy raramente en orina o semen	Nivel de contención 2 para las actividades que impliquen la manipulación de tejidos y fluidos corporales potencialmente infectados Nivel de contención 3 y precauciones del personal para las actividades con un elevado potencial de producción de salpicaduras y aerosoles y en la producción de grandes cantidades de elevadas concentraciones
Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)	Los riesgos ocupacionales de infección por el VIH, provienen fundamentalmente de la posibilidad de ser inoculados accidentalmente o por contacto de mucosas con sangre u otros fluidos corporales.	Cuando se trate de muestras no concentradas, la manipulación puede hacerse en un nivel de contención clase 2; por el contrario, los cultivos celulares de VIH y los preparados concentrados o purificados deberán hacerse en un nivel de contención 3

Tabla V. Cabinas de Flujo Laminar y Cabinas de Seguridad Biológica (CDC, 1995; Castilla et al. 2003)

Introducing the G5 Series.™

Optimising embryo development
in a protective in vitro environment.



The G5 Series.™
Helping nature succeed.



www.embiol.com

Vitrolife 
Innovative Cell and Tissue Technology

Vitrolife distributor: Equipos Médico-Biológicos, C/Can Ràbia 13, 08017 Barcelona, Tel: 934 123 721, Fax: 934 122 192, Email: barcelona@embiol.com, www.embiol.com
Vitrolife Sweden AB, Faktorvägen 13, SE-434 37 Kungälv, Sweden. Tel: +46-31-721 80 00, Fax: +46-31-721 80 90, E-mail: fertility@vitrolife.com



OOCYTE AND EMBRYO OXYGEN CONSUMPTION CAN IT TELL US ANYTHING ABOUT DEVELOPMENTAL POTENTIAL?

Lynette Scott, PhD, HCKD Fertility Centers of New England Reading, MA, USA

Embryo morphology is the only form of selection during human assisted reproductive technologies. Gamete (sperm and oocyte) morphology is not utilized due to the lack of sufficient data correlating any particular morphology with outcome. In order to get a functional embryo, both gametes must be normal. During any growth and development, an oocyte or embryo needs energy in the form of ATP, the majority of which is formed through oxidative respiration. During respiration oxygen is consumed and by measuring oxygen consumption, the level or rate of respiration could be calculated.

As the oocyte is developing, it uses about 90% of delivered oxygen for respiration but once it matures in the antral follicle this has dropped to about 70%. Cleaving embryos only use 30% of oxygen uptake for respiration, with the bulk being used in alternate cellular mechanisms. However, as the embryo begins to compact, form a blastocysts

and expand, the amount of oxygen used in respiration increases to approximately 70%.

Oxygen uptake or use by an oocyte or embryo can be measured in a non-destructive manner using an EmbryoScope. This is not a clinical technique as it is not entirely non-invasive but it has led to insights on gamete and embryo function, normality and ability to grow as related to oxygen consumption.

It was shown that oocytes at different stages of maturation have different levels of oxygen consumption and that oocytes that have the ability to continue developing have greater oxygen consumption than those that subsequently stopped growing. Oxygen consumption was correlated with known parameters that affect oocyte quality such as FSH levels and age. Oocytes from patients with advanced age or high FSH had lowered oxygen consumption.

Oocytes that fail to fertilize, but where there is no male factor, also had lowered oxygen consumption.

Oxygen fluxes or consumption in human embryos growing from the one cell to blastocysts stage, can be an indirect measure of their respiration. Embryos that continue developing have a very stable rate of oxygen consumption. Embryos that become atretic or stop developing have significantly reduced consumption rates prior to the demise. Oxygen consumption was not related to normality, merely to continued development with a 2 fold increase in consumption as the embryo forms a blastocyst. Oxygen consumption does not correlate with morphology only continued development. Aneuploid embryos have similar oxygen consumption to euploid embryos, if they continue cleaving.

INTEGRIDAD DEL ADN Y PATRÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA; INDICADORES DE CALIDAD ESPERMÁTICA Y ÉXITO REPRODUCTIVO

Marcos Meseguer, Sandra García-Herrero, Cristobal Aguilar, Thamara Vilorio, Nicolás Garrido
Instituto Valenciano de Infertilidad, Universidad de Valencia, Valencia, Spain;

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico del varón como fértil o infértil es extremadamente difícil, ya que este estado puede variar en un corto espacio de tiempo e incluso por existir diferentes parejas. Estas aseveraciones deben de considerarse desde el punto de vista de cada eyaculado.

La herramienta clásica para estimar el potencial fértil del varón es el análisis básico del semen como lo refleja la OMS (Wild et al. 2004). Este análisis se basa en la evaluación macroscópica y microscópica de las características del espermatozoide. Los resultados de este junto con los estudios en la mujer proveen a la pareja información para recomendar el tratamiento de reproducción asistida más apropiado teniendo en cuenta los costes (médicos, biológicos y económicos) y la efectividad de los ratios.

Un porcentaje importante de las parejas, incluso después de varios intentos, son incapaces de procrear, aunque se realizó un análisis de esterilidad concienzudo y no se detectó ninguna causa aparente o subyacente. Esto podría deberse en parte a algunos defectos espermáticos que no están siendo valorados en el espermiograma clásico (Garrido et al. 2008).

Entre los marcadores moleculares de infertilidad, existen muchos datos en la literatura algunos contradictorios respecto a la utilidad del estudio de la integridad del ADN. El estrés oxidativo (EO) en el espermatozoide también ha sido estudiado en profundidad en las últimas décadas como marcador de infertilidad masculina (Garrido et al. 2006, Alvarez and Agarwal. 2006) con la intención de predecir la habilidad para ser padre. Otros marcadores moleculares se han estudiado para

averiguar su capacidad predictiva en la fecundación y en el embarazo (Braundmeier and Miller. 2001, Meseguer et al. 2004a) y todos estos estudios demuestran que el origen de la infertilidad masculina es multifactorial.

Actualmente, la amplia variedad de análisis proporcionados por las -ómicas han sido implementados en los estudios de fertilidad (Martinez-Conejero et al. 2008, Horcajadas et al. 2007, Martinez-Heredia et al. 2006) permitiendo la caracterización de perfiles de fertilidad relacionados con la expresión de mRNA proteínas e incluso metabolitos.

Los modelos experimentales actualmente utilizados en reproducción asistida para caracterizar la infertilidad masculina presentan importantes sesgos, ya que el factor masculino es en muchas ocasiones ignorado, lo que permite hallar en muchas ocasiones relaciones espurias entre determinados parámetros y la infertilidad. Para solucionar este problema, la utilización del modelo de la donación de óvulos para estandarizar la calidad ovocitaria proporciona una herramienta muy poderosa (Meseguer et al. 2006b).

El objetivo de esta ponencia es recopilar la información generada hasta el momento en relación a algunos parámetros moleculares espermáticos relacionados con la infertilidad masculina y su potencial diagnóstico. Nos centraremos en el ADN y en el ARN mensajero. El primero es obviamente el que lleva la información genética para el futuro feto y su integridad puede estar afectada por el entorno lo que complicaría el proceso reproductivo. El segundo (ARNm) puede ser importante durante las primeras divisiones embrionarias (hasta que la maquinaria del embrión está activa). Las variaciones en los patrones de ARNm podrían ser determinantes en el éxito reproductivo.

INTEGRIDAD DEL ADN

Generalmente la cromatina espermática está muy organizada, siendo una estructura compacta de ADN con nucleoproteínas heterogéneas que protegen la integridad genética y facilitan el transporte del genoma paterno a través de los tractos reproductivos masculino y femenino (Manicardi et al. 1995). Por lo tanto la integridad del ADN es necesaria para la correcta transmisión de la información genética de vital importancia para mantener el embarazo.

ORIGEN DEL DAÑO EN EL ADN

Existen defectos intrínsecos que generan daño en ADN y estos incluyen deficiencias durante la espermiogénesis (periodo durante el cual las protaminas espermáticas son depositadas), o mutaciones que afectan adversamente la compactación del ADN. Las protaminas son responsables de la compactación del ADN y están fuertemente unidas a este y defectos en las mismas podría dañar componentes del ADN y su estructura (Oliva. 2006). Una etiología adicional es la que refiere que aquellos espermatozoides que entran en apoptosis (o muerte celular programada). Este proceso ocurre regularmente durante la vida adulta y ayuda a eliminar aquellas células que tienen alterada la función o son afuncionales, no obstante algunas células podrían escapar de esta limpieza y presenten altos niveles de ADN (Sakkas et al. 1996).

Además el propio metabolismo espermático genera especies reactivas del Oxígeno (ERO) que podrían afectar a la integridad del ADN, especialmente (O₂-), (H₂O₂) y (NO). No obstante los espermatozoides han desarrollado defensas contra los niveles excesivos de ERO y predominantemente incluye superóxido dismutasa (SOD), glutatión

peroxidasa (GPxs) y glutathion reductasa (GR) (Meseguer et al. 2004b, Santiso, R., Tamayo, M., Gosálvez, J., Meseguer, M., Garrido, N., Fernández, JL. 2009).

ERO pueden reaccionar con cualquier componente celular y el espectro de las modificaciones oxidativas dependen de la cantidad de ERO, el momento y la localización de esta generación y la presencia de los mecanismos de defensa. Concretamente estamos interesados en el efecto de ERO en el ADN en particular la formación de 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) uno de los mayores productos oxidativos del ADN (Figura 1).

El daño oxidativo lo encontramos en determinadas situaciones como consecuencia de la generación de radicales libres, estas incluyen enfermedad inflamatoria autoinmune y enfermedades neurodegenerativas, arterioesclerosis y los daños consecuencia de la isquemia. Estos daños también se observan durante procesos de mutagénesis y carcinogénesis originados por factores diversos como los agentes químicos las radiaciones y la actividad metabólica normal. El estrés oxidativo podría causar fragmentación en el ADN posiblemente como consecuencia de la oxidación del mismo (Garrido et al. 2004b).

Los factores externos como el calor, los agentes quimioterapéuticos la radiación y otras gonadotoxinas están asociadas con un aumento en de los espermatozoides con el ADN dañado. Pero además el cancer por si mismo se considera un factor intrínseco de daño en el ADN. Recientemente publicamos un trabajo en el que observamos un aumento en la fragmentación del ADN en los pacientes con cáncer que es comparable al de los pacientes infértiles (Meseguer et al. 2008b).

Otra causa potencial de daño en el ADN es la exposición a toxinas ambientales aunque en este campo los resultados son controvertidos (Sun et al. 1997). Lo cierto es que una de estas toxinas podría producirse por el consumo de tabaco que es uno de los hábitos tóxicos más comunes en la población general, el cual además es potencialmente capaz de inducir efectos deletéreos en los gametos (Viloria et al. 2005).

La relación entre el consumo de tabaco y el daño en el ADN se ha investigado en profundidad por Viloria y cols (Viloria et al. 2009, Rubio et al. 2007). Ellos determinaron elevados niveles de fragmentación en pacientes fumadores, sin embargo no detectaron un aumento en el daño oxidativo del ADN espermático. Esto sugiere que los elevados niveles de fragmentación encontrados en los varones fumadores no son consecuencia de la oxidación del ADN lo que también va en contra de que la fragmentación del ADN es precedida de la oxidación (Figura 2).

EVALUACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN ESPERMÁTICO; ESTUDIO EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Existen numerosos tests que directa o indirectamente evalúan el daño en el ADN, aquellos que estudian la fragmentación del ADN no son objetivo de esta charla y no los comentaremos. Para estudiar la oxidación del ADN nosotros utilizamos el OXI DNA assay kit basado en la unión de anticuerpo con fluoresceína a la 8 oxoguanina, presente en las células con ADN oxidado, esta fluoresceína se cuantifica utilizando citometría de flujo (Meseguer et al. 2008a).

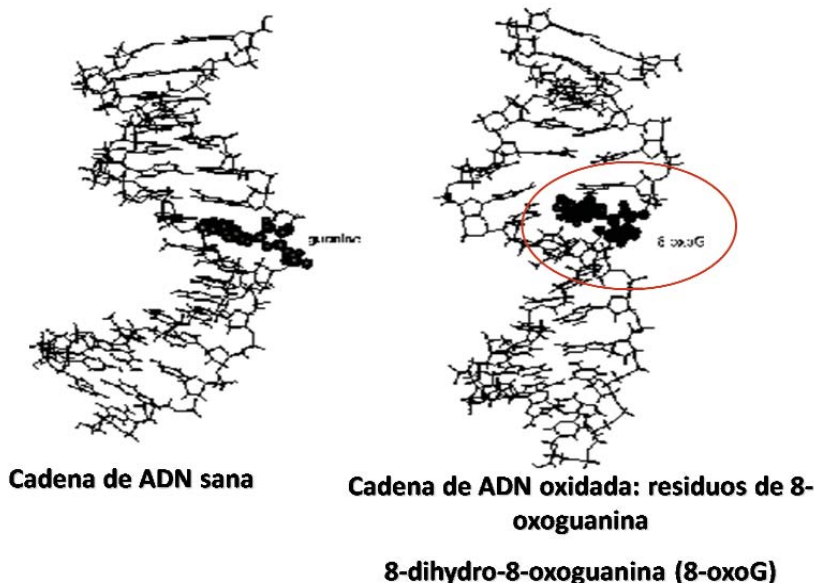


Figura 1. Transformación de la deoxyguanosina (dG) y la formación of 8-hydroxydeoxyguanosina (8-OHdG)

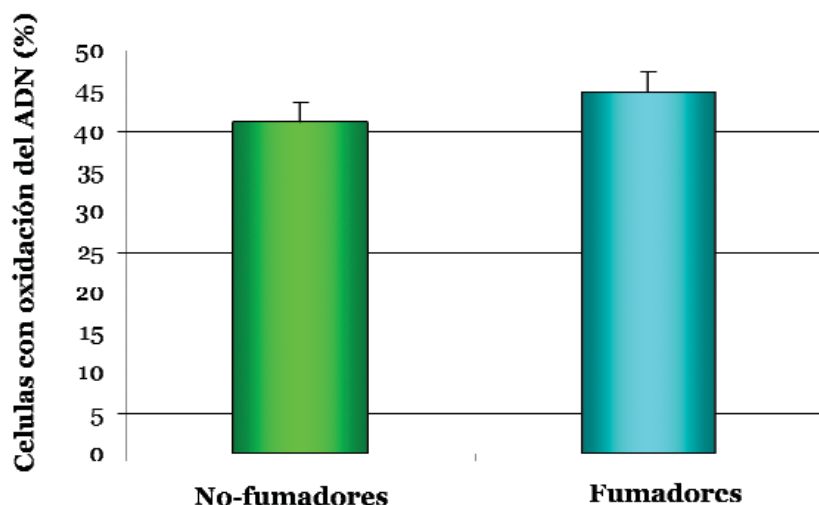


Figura 2. Porcentaje de espermatozoide con el ADN oxidado de acuerdo al consumo de tabaco del varón.

La infertilidad masculina está asociada a la pobre integridad del ADN espermático y se ha sugerido que estas anomalías podrían afectar a la capacidad de procreación de los varones teniendo relaciones sexuales regulares y en aquellos tratados con tratamientos de reproducción asistida (Larson-Cook et al. 2003, Muriel et al. 2006a, Muriel et al. 2006b).

En esta ponencia no repasaremos

Aunque observamos un aumento en los niveles de oxidación en aquellos pacientes que no consiguieron embarazo evolutivo, las diferencias no eran significativas. Esto podría deberse al proceso de selección antes de la transferencia, de manera que los embriones de mal pronóstico no se escogerían para transferencia. En ausencia de esa selección, sería posible observar una asociación entre la oxidación del ADN y el embarazo.

células inmunes, células mioides, fibroblastos, etc..., tetraploides; espermatoцитos primarios). Para determinar la ploidía celular realizamos una tinción dual con yoduro de propidio, permitiendo analizarla simultáneamente con la tinción del la 8-OHdG, separando entre categorías celulares como se muestra en la figura 3. Además fuimos capaces de distinguir entre células haploides espermáticas y no espermáticas analizando las formas

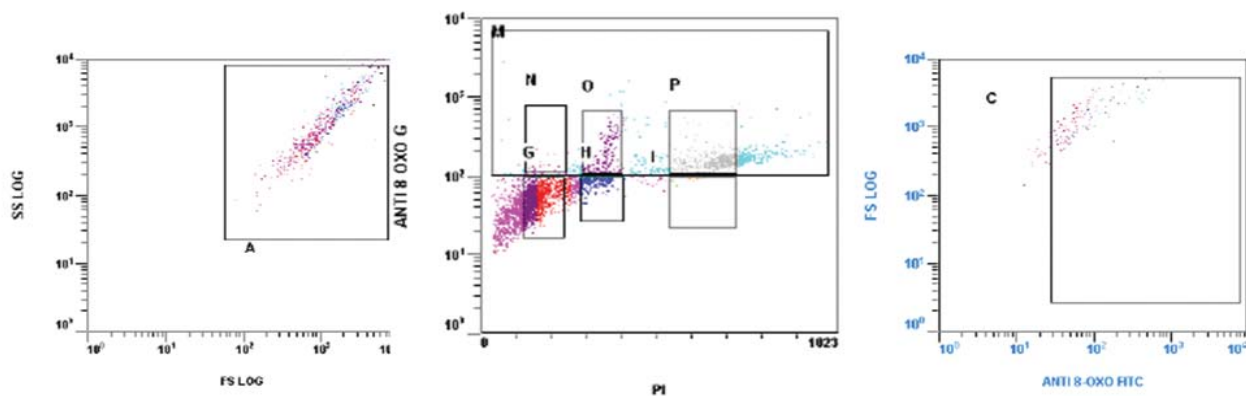


Figura 3. Histogramas de citometría de flujo sobre la ploidía y la oxidación de ADN en células testiculares. Las ventanas muestran A= células seleccionadas mediante el forward y side scatter, C=Células 8-OH positivas G= células haploides, H= células diploides, I= células tetraploides, M= total de células 8-OH positivas, N= células haploides 8-OH positivas, O= células diploides 8 OH positivas, P= células tetraploides 8 OH positivas.

aquellos estudios de nuestro grupo centrados en la fragmentación del ADN pero si determinaremos la relevancia de la oxidación del ADN en la calidad embrionaria y en el éxito reproductivo estudiando prospectivamente ciclos de donación donación de ovocitos emparejados, es decir aquellos casos donde donantes con buena respuesta originan una cohorte ovocitaria suficiente para dos receptoras, consiguiendo que una de las pocas diferencias entre los dos ciclos sea la muestra espermática diferente (Melo et al. 2006).

En referencia a la morfología embrionaria, realizamos un estudio detallado de todos los estadios del desarrollo. Se ha correlacionado la morfología embrionaria, basándonos en la división celular y la fragmentación embrionaria. Es más, observamos una importante asociación entre la asimetría embrionaria y altos niveles de oxidación del ADN espermático. Además, en los estadios más avanzados, aquellos embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto se asociaron con menores niveles de oxidación.

Además, analizando estas diferencias entre pacientes que compartieron cohorte ovocitaria (misma donante), observamos un claro aumento en las relaciones entre la calidad embrionaria y la oxidación del ADN. Conjuntamente el daño oxidativo esta asociado con una disminución de la motilidad espermática. Todas estas asociaciones encontradas apoyan la relevancia de la hidroxilación de la 8-oxoguanina como biomarcador de calidad espermática reflejando el daño de los radicales libres en los espermatozoides (Meseguer et al. 2008a).

Siguiendo en esta línea de trabajo, determinamos la relevancia de la oxidación del ADN originada por los radicales libres en los espermatozoides procedentes de testículo, analizando los tratamientos de reproducción asistida realizados con ellos y utilizando el modelo de donación de ovocitos para estandarizar el factor femenino.

Las células obtenidas del testículo presentan una amplia variedad de tipos y ploidías (haploides; espermatozoides y espermátidas redondas, diploides; espermatogonias, espermatoцитos secundarios, células de Leydig y Sertoli,

celulares en función de cómo se comporta el haz laser del citómetro al atravesar el espermatozoide. Cuando el porcentaje de células 8-OHdG positivas es considerado para cada ploidía, observamos un aumento en las azoospermias de origen no obstructivo (NO) en comparación con las obstructivas (O) pero solo considerando las células haploides. Aproximadamente un 4% más de células haploides presentan el DNA oxidado mientras que solo un existe un 1,5% de incremento cuando consideramos las células diploides, por último considerando las células tetraploides las diferencias en la señal de 8-OH estaban solo en un 0.16% estando de nuevo más oxidadas aquellas células procedentes de pacientes con azoospermia NO.

No encontramos ninguna relevancia clínica entre el estado de la oxidación del ADN espermático y tasa de fecundación junto con varios parámetros de calidad embrionaria (desarrollo temprano y desarrollo tardío; días 5-6), tampoco con la consecución de embarazo evolutivo (Aguilar et al. 2009).

PATRÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL; MICROARRAYS

En la última década, conocida como la era post-genómica, las herramientas de análisis genético han sufrido una revolución técnica. La entrada en escena de sistemas que permiten el análisis masivo de genes en un solo experimento vs. aquellos en los que sólo permitían el estudio gen por gen (o de un pequeño grupo de ellos) han proporcionado una nueva dimensión a la hora de plantear y extraer conclusiones de los experimentos. Los microarrays, que es como se conocen estos sistemas, fueron descritos por primera vez por Schenna en 1995 (Schen et al. 1995) y nos permiten estudiar, por ejemplo, qué genes se expresan en un situación biológica concreta y compararla con una patológica y ver en qué se diferencian, qué genes se expresan y en qué proporción, dándonos una visión global de una enfermedad y cuáles son los mecanismos que operan en dicho proceso patológico además de ser un potencial papel en el diagnóstico de enfermedades.

Básicamente el microarray es un formato experimental en el que una superficie sólida en las que están impresas miles de sondas que detectan genes de secuencia conocida.

Microarrays hay de diferentes tipos y su clasificación depende, por ejemplo, de los que queremos detectar (oligos, cDNA, proteínas...), del tipo de soporte (un slide, sílice o gel) o del tipo de impresión de las sondas en la matriz.

El caso que nos ocupa es el de los microarrays de expresión génica que nos permiten evaluar el conjunto de ARN mensajeros que se generan en un tejido o un grupo de células en una situación biológica determinada y saber que genes se expresan de manera diferencial en cada situación (Genes diferencialmente expresados (GDE)). En este caso la matriz contiene una serie de sondas que son unos oligonucleótidos sintéticos que serán expuestos a un pool de ARN mensajeros que son extraídos de las muestras biológicas que queremos estudiar.

Las muestras biológicas que nuestro grupo ha estudiado son de semen de

donantes y pacientes que se someten a diversas técnicas de reproducción asistida (TRAs). También nuestro grupo planteó la hipótesis de que debe haber diferencias entre las muestras de semen que consiguen un embarazo frente a aquellas que no, y que además estas, eran indetectables para el espermiograma.

Las diferencias pues se pueden encontrar a un nivel molecular, a nivel de los ARN mensajeros presentes en el escaso citoplasma presente en el espermatozoide y que parece que están implicados en el proceso de fecundación y en las primeras divisiones embrionarias (Ostermeier et al. 2005a, Ostermeier et al. 2005b, Ostermeier et al. 2004, Miller and Ostermeier. 2006a, Miller and Ostermeier. 2006a, Miller and Ostermeier. 2006b, Miller et al. 2005)

Asimismo se planteó que los requerimientos moleculares de las muestras de semen capaces de lograr un embarazo no son los mismos para todas las TRAs, siendo más cuánto menos invasivas son, por ejemplo en una IAH, frente a las que más, como es el caso de ICSI.

DIFERENCIAS DE EXPRESIÓN GÉNICA ASOCIADOS A LA INFERTILIDAD MASCULINA

Nuestro grupo ha realizado varias comparaciones para ver las diferencias moleculares (a nivel de expresión génica, esto es a nivel de los genes que se expresan de manera diferencial (GDE)) en el semen de hombres que embarazan a sus parejas frente a aquellos que no y el objetivo a largo plazo es diseñar una herramienta diagnóstica complementaria al espermiograma para evaluar el potencial fértil de una muestra de semen basada en la tecnología del microarray.

Con este objetivo en mente se realizó un experimento en el que se comparaban muestras de semen de donantes con una fertilidad probada (ya habían sido padres con el programa de donación) y se comparó con semen de pacientes que acudían a la clínica porque no concebían de manera natural (Garrido et al. 2008). Tanto donantes como pacientes presentaban parámetros seminales similares y dentro de lo normal. Una vez

realizados los microarrays se observó, que efectivamente, la expresión de los genes era diferente en ambos grupos y que estas diferencias podrían en parte explicar el mayor o menor éxito reproductivo de un grupo u otro.

El siguiente paso fue estudiar pacientes que conseguían embarazo frente a aquellos que no tras someterse a la misma técnica de reproducción asistida, tanto a una Inseminación artificial homóloga (IAH) como a una microinyección intracitoplásmica (ICSI).

DONANTES VS. PACIENTES

Se hizo una comparación entre muestras de semen de donantes de fertilidad probada que ya habían sido padres dentro del programa de donación de esperma y pacientes que acudían a nuestra clínica ante la imposibilidad de concebir de manera natural (Garrido et al. 2008). Ambos grupos presentaban parámetros seminales normales según las indicaciones de la OMS de 1999 y sin diferencias significativas entre los parámetros de los donantes y de los pacientes. También se examinaron las parejas femeninas de los pacientes incluidos en el estudio. Todas ellas eran menores a 37 años y no presentaban ninguna patología asociada a la incapacidad de quedarse embarazada (ovario poliquístico, obstrucción tubárica o endometriosis).

Una vez realizado el array los resultados obtenidos indicaban grandes diferencias entre ambos grupos. Un total de 1662 genes se expresaban diferencialmente en el grupo de donantes y 1568 en el grupo de pacientes. Un posterior análisis de esos genes con una herramienta de ontología génica (que nos permite conocer las asociaciones complejas que forman un grupo determinado de genes y ver en que procesos biológicos están implicados) nos mostró más diferencias, esta vez a nivel de asociación en redes biológicas complejas (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) (Gene Ontology Consortium. 2006, Huang et al. 2007). Por ejemplo, alguno de los procesos que salían estadísticamente significativos al analizar los GDE en el grupo de donantes con un claro papel reproductivo eran la espermatogénesis,

generación de los gametos masculinos, desarrollo de las espermatidas o reproducción sexual. Sin embargo estos procesos no aparecen cuando se analizan los 1568 GDE de pacientes. Esto puede indicar que estos sistemas son más operativos en el grupo de los donantes y por eso su tasa de éxito reproductivo.

PACIENTES SOMETIDOS A IAH; EMBARAZO VS NO EMBARAZO

El siguiente paso era el de comparar muestras de pacientes que lograban embarazo frente aquellos que no (estudio de casos y controles), sometiéndose todos ellos a su primer ciclo de IAH, teniendo ellos una recuperación de espermatozoides móviles mayor de 3 millones y ellas cumplían todos los requisitos anteriormente mencionados en la comparación de donantes frente pacientes.

Los resultados también reflejaron claras diferencias entre ambos grupos, si bien estas diferencias no eran ni tantas ni tan claras como cuando se comparaban los donantes frente a los pacientes.

Encontramos 756 GDE en el grupo que embaraza y 194 en el grupo que no lograba embarazo y el análisis ontológico no encontramos procesos biológicos con un claro papel en la reproducción descrito.

PACIENTES SOMETIDOS A CICLOS DE ICSI CON OVOCITOS DONADOS.

Para este experimento se escogieron 5 casos, cada caso constaba de 2 parejas de pacientes que se sometían a un proceso de ICSI con semen fresco propio y ovocitos de la misma donante (modelo explicado anteriormente en el que finalmente quedando embarazada sólo una de ellas), siendo el diseño un estudio de casos y controles.

Las ventajas de este modelo son la estandarización del factor femenino usando ovocitos de donantes jóvenes, además una pareja se queda embarazada y otra no con los ovocitos de una misma paciente y de la misma cohorte ovocitaria con lo que el factor femenino aún se estandariza mucho más. Por

último se usaron para los experimentos alícuotas del semen con el que luego se iba a realizar el ciclo de ICSI.

Teníamos 5 casos (5 sémenes que embarazaban (Grupo E, n=5) y 5 que no (Grupo NE, n=5)), se procedió a hacer agrupaciones (pools) de ambos grupos y se realizó el microarray.

Los resultados volvieron a evidenciar diferencias entre ambos grupos, en el grupo E teníamos 44 GDE y en NE sólo 5.

Entre los 44 GDE del grupo que logra el embarazo cabe destacar los siguientes genes que pueden tener alguna papel en la función reproductora.

Der los 44 GDE, 4 son catepsinas (9% de los GDE del grupo E). En mamíferos como la oveja, el toro o el ratón que están implicadas en los procesos de implantación y placentación (Sireesha et al. 2008, Song et al. 2007). Además están implicadas en los procesos proteolíticos que juegan un papel en la remodelación del epitelio seminífero en testículos de roedores (Jervis and Robaire. 2001, Anway et al. 2004).

La apolipoproteína E implicada en la espermatogénesis y en la maduración espermática en ratas (Law et al. 1997).

La proteína epididimal secretora E1 o NPC2 puede estar implicada en la regulación de la composición de las membranas del espermatozoide durante la segregación del epidídimo ya que está relacionada con el transporte del colesterol durante la maduración espermática (<http://www.expasy.ch/>) (Legare et al. 2006).

También hay varias metaloproteasas, que están implicadas en la protección en las espermatogonias, espermatoцитos y células de Sertoli frente al efecto tóxico de metales pesados como el cadmio haciendo a estos tejidos más resistentes al daño producido por la acción de los mismos (Kusakabe et al. 2008a, Kusakabe et al. 2008b).

La galectina 3 parece estar implicada en la maduración y activación de los espermatozoides en toros y cerdos.

Finalmente cabe destacar la familia de

las glutatión peroxidasas, en este caso la GPX1, cuyos niveles (junto con los de la GPX4) son importantes para proteger al espermatozoide del daño celular tras la descongelación. También se ha encontrado una correlación entre niveles de la glutatión peroxidasas 1 la calidad embrionaria en día 3. (Garrido et al. 2004a, Meseguer et al. 2006a, Meseguer et al. 2004c).

CONCLUSIONES

Hay evidencias de que existen diferencias a nivel molecular (en este caso de integridad del ADN y de perfiles de expresión génica) entre las muestras de semen en función de su calidad que se ve reflejada en aquellas muestras que consiguen embarazar a sus parejas frente aquellas que no lo consiguen.

Estas diferencias pueden ser utilizadas como marcadores de potencial fértil de las muestras de semen.

Las diferencias en la integridad del ADN espermático se observan dentro y entre pacientes, están influenciadas por factores externos y pueden condicionar el éxito reproductivo aunque la maquinaria reparadora ovocitaria juega un papel decisivo.

Las diferencias de expresión génica entre las muestras de semen son cada vez menores a medida que el tratamiento al que se someten es más invasivo. Sólo hay que tener en cuenta el número de genes que están diferencialmente expresados cuando se analizan los donantes frente a los pacientes en general que cuando esta comparación se hace pacientes frente a paciente (en el caso de las IAH o ICSI) (Figura 4).

REFERENCIAS

- Aguilar, C., Meseguer, M., Garcia-Herrero, S., Gil-Salom, M., O'Connor, J.E. and Garrido, N. (2009) Relevance of testicular sperm DNA oxidation for the outcome of ovum donation cycles. *Fertil. Steril.*
- Alvarez, J.G. and Agarwal, A. (2006) Development of a novel home sperm test - what are the limitations? *Hum. Reprod.*, 21, 3029-30; author reply 3030-1.

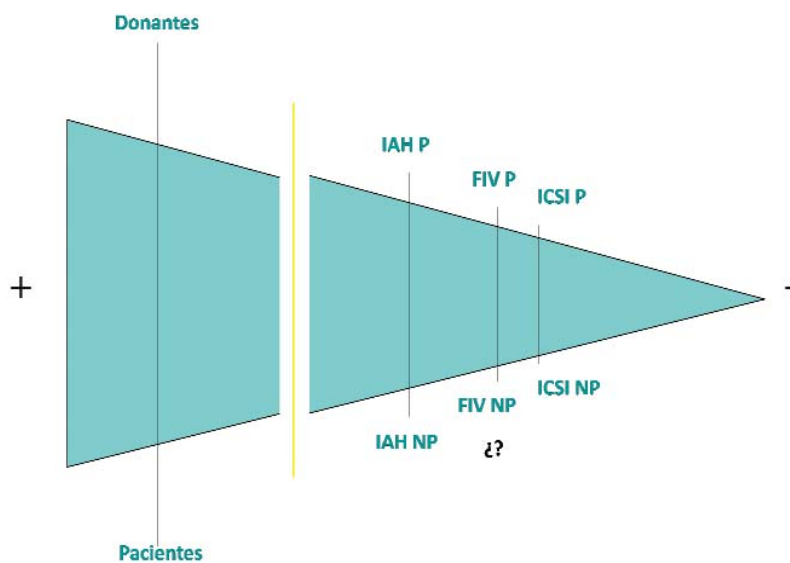


Figura 4. Representación de las diferencias de expresión génica entre las muestras de semen a medida que el tratamiento al que se someten es más invasivo.

Anway, M.D., Wright, W.W., Zirkin, B.R., Korah, N., Mort, J.S. and Hermo, L. (2004) Expression and localization of cathepsin k in adult rat sertoli cells. *Biol. Reprod.*, 70, 562-569.

Braundmeier, A.G. and Miller, D.J. (2001) The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. *J. Dairy Sci.* ; *J. Dairy Sci.*, 84, 1915-1925.

Garrido, N., Martínez-Conejero, J.A., Jauregui, J., Horcajadas, J.A., Simon, C., Remohi, J. and Meseguer, M. (2008) Microarray analysis in sperm from fertile and infertile men without basic sperm analysis abnormalities reveals a significantly different transcriptome. *Fertil. Steril.*,

Garrido, N., Meseguer, M., Alvarez, J., Simon, C., Pellicer, A. and Remohi, J. (2004a) Relationship among standard semen parameters, glutathione peroxidase/glutathione reductase activity, and mRNA expression and reduced glutathione content in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men. *Fertil. Steril.*, 82 Suppl 3, 1059-1066.

Garrido, N., Meseguer, M., Simon, C., Pellicer, A. and Remohi, J. (2004b) Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J. Androl.*, 6, 59-65.

Garrido, N., Remohi, J., Martínez-Conejero, J.A., García-Herrero, S., Pellicer, A. and Meseguer, M. (2008) Contribution of sperm molecular features to embryo quality and

assisted reproduction success. *Reprod. Biomed. Online*, 17, 855-865.

Garrido, N., Remohi, J., Pellicer, A. and Meseguer, M. (2006) The effectiveness of modified sperm washes in severely oligoasthenozoospermic men infected with human immunodeficiency and hepatitis C viruses. *Fertil. Steril.*, 86, 1544-1546.

Gene Ontology Consortium (2006) The Gene Ontology (GO) project in 2006. *Nucleic Acids Res.* ; *Nucleic Acids Res.*, 34, D322-6.

Horcajadas, J.A., Pellicer, A. and Simon, C. (2007) Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: new times, new opportunities. *Hum. Reprod. Update*; *Hum. Reprod. Update*, 13, 77-86.

Huang da, W., Sherman, B.T., Tan, Q., Kir, J., Liu, D., Bryant, D., Guo, Y., Stephens, R., Baseler, M.W., Lane, H.C., et al (2007) DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic Acids Res.* ; *Nucleic Acids Res.*, 35, W169-75.

Jervis, K.M. and Robaire, B. (2001) Dynamic changes in gene expression along the rat epididymis. *Biol. Reprod.*, 65, 696-703.

Kusakabe, T., Nakajima, K., Nakazato, K., Suzuki, K., Takada, H., Satoh, T., Oikawa, M., Arakawa, K. and Nagamine, T. (2008a) Changes of heavy metal, metallothionein and heat shock proteins in Sertoli cells induced by cadmium exposure. *Toxicol. In Vitro.*, 22, 1469-1475.

Kusakabe, T., Nakajima, K., Suzuki, K., Nakazato, K., Takada, H., Satoh, T., Oikawa, M., Kobayashi, K., Koyama, H., Arakawa, K., et al (2008b) The changes of heavy metal and metallothionein distribution in testis induced by cadmium exposure. *Biometals*, 21, 71-81.

Larson-Cook, K.L., Brannian, J.D., Hansen, K.A., Kasperson, K.M., Aamold, E.T. and Evenson, D.P. (2003) Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil. Steril.* ; *Fertil. Steril.*, 80, 895-902.

Law, G.L., McGuinness, M.P., Linder, C.C. and Griswold, M.D. (1997) Expression of apolipoprotein E mRNA in the epithelium and interstitium of the testis and the epididymis. *J. Androl.*, 18, 32-42.

Legare, C., Thabet, M., Gatti, J.L. and Sullivan, R. (2006) HE1/NPC2 status in human reproductive tract and ejaculated spermatozoa: consequence of vasectomy. *Mol. Hum. Reprod.*, 12, 461-468.

Manicardi, G.C., Bianchi, P.G., Pantano, S., Azzoni, P., Bizzaro, D., Bianchi, U. and Sakkas, D. (1995) Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol. Reprod.* ; *Biol. Reprod.*, 52, 864-867.

Martínez-Conejero, J.A., Garrido, N., Remohi, J., Pellicer, A., Simon, C. and Meseguer, M. (2008) MUC1 in human testis and ejaculated spermatozoa and its relationship to male fertility status. *Fertil. Steril.*, 90, 450-452.

Martínez-Heredia, J., Estanyol, J.M., Ballesca, J.L. and Oliva, R. (2006) Proteomic identification of human sperm proteins. *Proteomics*; *Proteomics*, 6, 4356-4369. Melo, M.A., Meseguer, M., Garrido, N., Bosch, E., Pellicer, A. and Remohi, J. (2006) The significance of premature luteinization in an oocyte-donation programme. *Hum. Reprod.*, 21, 1503-1507.

Meseguer, M., de los Santos, M.J., Simon, C., Pellicer, A., Remohi, J. and Garrido, N. (2006a) Effect of sperm glutathione peroxidases 1 and 4 on embryo asymmetry and blastocyst quality in oocyte donation cycles. *Fertil. Steril.*, 86, 1376-1385.

- Meseguer, M., de los Santos, M.J., Simon, C., Pellicer, A., Remohi, J. and Garrido, N. (2006b) Effect of sperm glutathione peroxidases 1 and 4 on embryo asymmetry and blastocyst quality in oocyte donation cycles. *Fertil. Steril.* ; *Fertil. Steril.*, 86, 1376-1385.
- Meseguer, M., Garrido, N., Martinez-Conejero, J.A., Simon, C., Pellicer, A. and Remohi, J. (2004a) Relationship between standard semen parameters, calcium, cholesterol contents, and mitochondrial activity in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile males. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 21, 445-451.
- Meseguer, M., Garrido, N., Simon, C., Pellicer, A. and Remohi, J. (2004b) Concentration of glutathione and expression of glutathione peroxidases 1 and 4 in fresh sperm provide a forecast of the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *J. Androl.*, 25, 773-780.
- Meseguer, M., Garrido, N., Simon, C., Pellicer, A. and Remohi, J. (2004c) Concentration of glutathione and expression of glutathione peroxidases 1 and 4 in fresh sperm provide a forecast of the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *J. Androl.* ; *J. Androl.*, 25, 773-780.
- Meseguer, M., Martinez-Conejero, J.A., O'Connor, J.E., Pellicer, A., Remohi, J. and Garrido, N. (2008a) The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study a male infertility prognostic factor. *Fertil. Steril.*, 89, 1191-1199.
- Meseguer, M., Santiso, R., Garrido, N. and Fernandez, J.L. (2008b) The effect of cancer on sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin dispersion test. *Fertil. Steril.*, 90, 225-227.
- Miller, D. and Ostermeier, G.C. (2006a) Spermatozoal RNA: Why is it there and what does it do? *Gynecol. Obstet. Fertil.* ; *Gynecol. Obstet. Fertil.*, 34, 840-846.
- Miller, D. and Ostermeier, G.C. (2006b) Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Hum. Reprod. Update; Hum. Reprod. Update*, 12, 757-767.
- Miller, D., Ostermeier, G.C. and Krawetz, S.A. (2005) The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends Mol. Med.* ; *Trends Mol. Med.*, 11, 156-163.
- Muriel, L., Garrido, N., Fernandez, J.L., Remohi, J., Pellicer, A., de los Santos, M.J. and Meseguer, M. (2006a) Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 85, 371-383.
- Muriel, L., Garrido, N., Fernandez, J.L., Remohi, J., Pellicer, A., de los Santos, M.J. and Meseguer, M. (2006b) Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* ; *Fertil. Steril.*, 85, 371-383.
- Oliva, R. (2006) Protamines and male infertility. *Hum. Reprod. Update; Hum. Reprod. Update*, 12, 417-435.
- Ostermeier, G.C., Goodrich, R.J., Diamond, M.P., Dix, D.J. and Krawetz, S.A. (2005a) Toward using stable spermatozoal RNAs for prognostic assessment of male factor fertility. *Fertil. Steril.* ; *Fertil. Steril.*, 83, 1687-1694.
- Ostermeier, G.C., Goodrich, R.J., Moldenhauer, J.S., Diamond, M.P. and Krawetz, S.A. (2005b) A suite of novel human spermatozoal RNAs. *J. Androl.* ; *J. Androl.*, 26, 70-74.
- Ostermeier, G.C., Miller, D., Huntriss, J.D., Diamond, M.P. and Krawetz, S.A. (2004) Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature; Nature*, 429, 154.
- Rubio, C., Rodrigo, L., Mercader, A., Mateu, E., Buendia, P., Pehlivan, T., Vitoria, T., De los Santos, M.J., Simon, C., Remohi, J., et al (2007) Impact of chromosomal abnormalities on preimplantation embryo development. *Prenat. Diagn.*, 27, 748-756.
- Sakkas, D., Urner, F., Bianchi, P.G., Bizzaro, D., Wagner, I., Jaquenoud, N., Manicardi, G. and Campana, A. (1996) Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* ; *Hum. Reprod.*, 11, 837-843.
- Santiso, R., Tamayo, M., Gosálvez, J., Meseguer, M., Garrido, N., Fernández, J.L. (2009) SIMULTANEOUS DETERMINATION IN SITU OF DNA FRAGMENTATION AND 8-OXOGUANINE IN HUMAN SPERM. *Fertil. Steril.*,
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. and Brown, P.O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270, 467-470.
- Sireesha, G.V., Mason, R.W., Hassanein, M., Tonack, S., Navarrete Santos, A., Fischer, B. and Seshagiri, P.B. (2008) Role of cathepsins in blastocyst hatching in the golden hamster. *Mol. Hum. Reprod.*, 14, 337-346.
- Song, G., Bazer, F.W. and Spencer, T.E. (2007) Differential expression of cathepsins and cystatin C in ovine uteroplacental tissues. *Placenta*, 28, 1091-1098.
- Sun, J.G., Jurisicova, A. and Casper, R.F. (1997) Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol. Reprod.*, 56, 602-607.
- Vitoria, T., Meseguer, M., Martinez-Conejero, J.A., O'Connor, J.E., Remohi, J., Pellicer, A. and Garrido, N. (2009) Cigarette smoking affects specific sperm oxidative defense but does not cause oxidative DNA damage in infertile men. *Fertil. Steril.*,
- Vitoria, T., Rubio, M.C., Rodrigo, L., Calderon, G., Mercader, A., Mateu, E., Meseguer, M., Remohi, J. and Pellicer, A. (2005) Smoking habits of parents and male: female ratio in spermatozoa and preimplantation embryos. *Hum. Reprod.*, 20, 2517-2522.
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R. and King, H. (2004) Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care; Diabetes Care*, 27, 1047-1053.



Pedidos sin
calendario
y entregas
en las 24/48 h

NUESTRA LÍNEA
DE PRODUCTOS :

BioCare Europe

es una empresa que actúa exclusivamente
en el sector de la reproducción asistida.

Desde 1997 brinda a los especialistas
de este sector un servicio con un perfil
muy profesional y especializado.

BioCare Europe es especializada
en el abastecimiento de material de consumo,
medios de cultivo, micropipetas,
agujas de punción y placas de Nunc



REPROLINE

medical



nunc™

**HUNTER
SCIENTIFIC
LIMITED**



www.biocareeurope.com

ifo@biocareeurope.com

Tel. +39.06.44.24.03.41

Fax +39.06.44.24.03.58

Número Verde desde España:
900993936

IMPACTO DEL GRADO DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN LOS RESULTADOS EN FIV CONVENCIONAL E ICSI

Jorge Ten, Joaquín Llácer, Belén Lledó, Adoración Rodríguez, Ruth Morales, Rafael Bernabeu
Instituto Bernabeu Alicante

NOTA ACLARATORIA: Los datos presentados en este resumen están pendientes de publicación. Estos datos pueden sufrir alguna modificación hasta el momento de su presentación.

INTRODUCCIÓN

La esterilidad afecta al 10-15% de las parejas (WHO, 1987), siendo el factor masculino responsable en aproximadamente el 50% de los casos (Huynh Ty cols., 2002). Este hecho hace que en los últimos años se hayan puesto en marcha técnicas de biología molecular y genética encaminadas a la profundización del estudio masculino a nivel cromosómico (fluorescence in situ hybridization (FISH) en espermatozoides y microdelecciones del cromosoma Y) y a nivel de la integridad estructural del ADN espermático. Respecto a esta integridad del ADN, son varios los factores descritos que pueden producir un daño en el mismo (Álvarez y Lewis, 2008):

-Apoptosis durante el proceso de la espermatogénesis.

-Roturas del ADN producidas durante la remodelación de la cromatina del espermatozoide durante la espermiogénesis.

-Fragmentación post-testicular, inducida principalmente por radicales libres de oxígeno durante el transporte de los espermatozoides a través de los túbulos seminíferos y epidídimo.

-Fragmentación inducida por endonucleasas endógenas.

-Tratamientos de radio y quimioterapia.

-Tóxicos ambientales.

Las técnicas que existen para estudiar la fragmentación del ADN espermático se

pueden dividir en dos grupos. En primer lugar se encuentran aquellas que miden la susceptibilidad diferencial del ADN para ser desnaturalizado por diversos tratamientos.

En este grupo se encuentran las siguientes:

SCSA o Sperm Chromatin Structure Assay
DBD-FISH o DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization.
SCD o Sperm Chromatin Dispersion Ensayo cometa .

Y en el segundo grupo se incluyen aquellas que marcan las roturas en la cadena de ADN, porque incorporan moléculas marcadas con fluorocromos en los extremos de rotura:

TUNEL o Terminal dUTP Nick-End Labeling .

ISNT o In Situ Nick Translation.

En el presente estudio se determina el índice de fragmentación del ADN (DFI) a través de la técnica TUNEL, ya que como se ha indicado anteriormente mide el daño real que existe en la muestra seminal analizada y no la susceptibilidad al daño. Esta técnica se está imponiendo como la más adecuada para establecer el nivel de fragmentación en el ADN espermático (Álvarez y Lewis, 2008)

Se han intentado correlacionar los valores de DFI con los resultados de las técnicas de reproducción asistida (TRA) para establecer un punto de corte que permita predecir el resultado de las mismas. En este sentido, parece ser que las muestras de semen que muestran niveles elevados de daño en el ADN y que son empleadas en los ciclos de FIV e ICSI podrían estar asociadas con una disminución de las tasas de fecundación, un empeoramiento de la calidad de los embriones, incluyendo el bloqueo de los mismos, una disminución de la tasa de

implantación y un incremento de la tasa de aborto (Lopes y cols., 1998; Larson y cols., 2000). No obstante, la metodología empleada para medir la integridad del ADN espermático, así como el diseño de la mayor parte de los estudios publicados hasta la fecha, hacen que no podamos establecer una correlación fiable y predictiva entre el DFI y el éxito/fracaso de los tratamientos de reproducción asistida (Collins y cols., 2008; The Practice Committee of The American Society for Reproductive Medicine, 2008).

El objetivo del presente trabajo es conocer si existe una influencia real del DFI medido mediante TUNEL en los resultados tras FIV e ICSI.

Si realmente encontramos una correlación positiva, se podrían poner en marcha tratamientos antioxidantes encaminados a disminuir el daño en el ADN espermático, incrementando las tasas de éxito. Por el contrario, si no encontramos efectos negativos, supondría desestimar este tipo de pruebas, abaratando el coste de los tratamientos reproductivos.

METODOLOGÍA DISEÑO:

Estudio prospectivo randomizado y a doble ciego entre el Instituto Bernabeu de Alicante, el Instituto Bernabeu de Elche y el Instituto Bernabeu Biotech, llevado a cabo entre Abril de 2008 y Julio de 2009.

Se establecieron dos grupos de estudio:

1) Evaluación de la incidencia del DFI sobre los resultados tras ICSI:

Un total de 68 parejas realizaron un ciclo ICSI por factor masculino en el Instituto Bernabeu de Alicante, cumpliendo unos criterios:

· El recuento de espermatozoides en la muestra seminal fue superior a 1×10^6 spz/ml.

· La edad de la mujer fue inferior a 38 años. De esta forma evitamos el sesgo en los resultados debido a una edad materna avanzada.

· Tras un protocolo de estimulación ovárica, la mujer se sometió a una punción ovárica en la que se recuperaron un mínimo de 6 ovocitos maduros (metafases II) que fueron microinyectados mediante ICSI.

2) Evaluación de la incidencia del DFI sobre los resultados tras FIV:

En total, 113 parejas se sometieron a un ciclo FIV con donación anónima de ovocitos por fallo ovárico en el Instituto Bernabeu de Alicante. La calidad seminal de los varones fue normal (normozoospermia, WHO, 1997), lo que nos permitió realizar en todos los casos un FIV sin microinyección. Tras un protocolo de estimulación ovárica, la donante de ovocitos se sometió a una punción ovárica. La inseminación fue llevada a cabo con un mínimo de 6 ovocitos con la muestra capacitada del cónyuge de la receptora. El grosor endometrial fue normal en todos los casos, no existiendo ninguna alteración en la cavidad uterina de las receptoras.

ESTIMULACIÓN OVÁRICA CONTROLADA:

El Comité Médico del instituto Bernabeu asignó a las pacientes protocolos específicos de estimulación ovárica en función de su historia clínica. Se emplearon gonadotropinas exógenas y se llevaron a cabo controles exhaustivos mediante ecografías y análisis seriados de estradiol. La ovulación fue desencadenada mediante la administración de gonadotropina coriónica humana (HCG) o agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).

RECUPERACIÓN OVOCITARIA:

Tras 34-36 horas post-HCG o agonistas de la GnRH, los complejos ovocito-corona-cúmulo fueron obtenidos mediante aspiración folicular transvaginal guiada mediante

ultrasonido en un medio tamponado (G-Rinse, Vitrolife, Goteborg, Suecia) en tubos de 14 ml. Estos tubos se pasaron al laboratorio de FIV, donde se procedió a la búsqueda de los complejos, los cuales fueron lavados en un medio tamponado (G-MOPS®; Vitrolife, Goteborg, Suecia) y distribuidos en pocillos con un medio específico (G-IVF®, Vitrolife, Goteborg, Suecia) hasta su inseminación o microinyección.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS SEMINALES:

Las muestras de semen fueron obtenidas el mismo día de la recuperación ovocitaria mediante masturbación tras un período de abstinencia de 3-5 días. Tras su licuefacción, los parámetros analizados incluyeron: volumen, concentración, movilidad y morfología. La metodología y los criterios para valorar la calidad seminal son los establecidos por la Organización Mundial de la Salud. Las muestras fueron capacitadas siguiendo un protocolo de gradientes de densidad con PureSpermâ100 (Nidacon International AB, Goteborg, Suecia). Utilizamos un gradiente de dos fases, una al 80% y otra al 40%.

Para llevar a cabo la FIV, la muestra fue ajustada a un volumen final de 3×10^6 spz/ml. En el caso de la ICSI, se cogieron alícuotas de mayor o menor concentración en función de las características de la muestra.

FIV E ICSI:

Entre 3-5 horas tras la obtención de los complejos ovocito-corona-cúmulo, se llevó a cabo la FIV convencional o la ICSI.

Para la FIV, se inseminó con 150.000 espermatozoides por pocillo. Se procedió a la inseminación de cada pocillo en campana de flujo y a 37°. Cubrimos los pocillos con 300 µl de aceite mineral estéril (Ovoil; Vitrolife, Goteborg, Sweden) e incubamos a 37° C y atmósfera al 6% de CO₂. En cada pocillo hubo un máximo de 5 complejos ovocito-corona-cúmulo.

Para la microinyección, las células del cúmulo fueron eliminadas mediante su exposición en un medio con 80 UI de

hialuronidasa (Hyase, Vitrolife, Goteborg, Suecia), quedando los ovocitos liberados de sus células de granulosa. Sólo fueron microinyectados aquellos ovocitos en metafase II o maduros. Inmediatamente tras la ICSI, los ovocitos fueron cultivados de forma individual en microgotas de 50 µl de medio G-IVF cubiertos con aceite mineral estéril a 37°C en una atmósfera de 6% de CO₂.

FIJACIÓN DE LAS MUESTRAS CAPACITADAS PARA LA DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO:

En el mismo momento de la realización de la FIV o la ICSI, una alícuota de cada muestra seminal capacitada (30 µl) fue extendida sobre un portaobjetos para su fijación. Una vez las muestras quedaron secas, les fue asignado un código y se remitieron al Instituto Bernabeu Biotech para la determinación de la fragmentación del ADN mediante la técnica TUNEL.

DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO:

En las extensiones seminales se determinó la fragmentación del ADN mediante la técnica TUNEL empleando el Kit de la casa comercial Roche y siguiendo en todo momento sus indicaciones técnicas. Para evaluar el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado ó DFI se usó un microscopio de fluorescencia con un objetivo de inmersión 100x. El DFI se determinó como el cociente entre el número de espermatozoides en los que se detecta fluorescencia verde (DNA fragmentado) y el número total de espermatozoides contabilizados por tinción con DAPI. Se evaluaron aproximadamente 500 espermatozoides totales por cada muestra. Un valor del DFI igual o superior al 15% fue considerado como patológico.

COMPROBACIÓN DE LA FECUNDACIÓN:

Los ovocitos con una fecundación correcta presentaron dos pronúcleos y extrusión del segundo corpúsculo polar 16-18 horas tras la FIV o la microinyección. El resto de ovocitos fueron clasificados como no fecundados o con fecundación anómala (haploides,

triploides, etc.). Los ovocitos fecundados fueron pasados de forma individual a microgotas de 50 µl de medio G.1 (Vitrolife, Sweden) cubiertos con aceite mineral estéril a 37°C en una atmósfera de 6% de CO₂ para controlar su desarrollo posterior.

VALORACIÓN DE LA CALIDAD EMBRIONARIA, TRANSFERENCIA Y EMBARAZO:

Tras 44-47 horas, 67-71 horas, 94-98 horas, 112-120 horas y 136-140 horas se observaron los embriones en microscopio invertido a 400 aumentos para valorar su calidad y establecer cuales eran los embriones que se transferían al útero materno y cuales se congelaban o desecharan por mala calidad. Los criterios establecidos para valorar dicha calidad fueron los de ASEBIR (Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción). La transferencia embrionaria se realizó en día 2 (D+2), día 3 (D+3) o día 5 (D+5) en función del número de embriones evolutivos y de su morfología. El número de embriones a transferir dependió de la historia médica y de su calidad.

Los embriones fueron transferidos a la cavidad uterina mediante una cánula Rocket® (Embryo transfer catheter Rocket Medical, Washington, UK), con ayuda de un ecógrafo.

Tras 13-14 días post-punción se realizó un test de embarazo (determinación de β-hCG en sangre). La confirmación de embarazo fue llevada a cabo mediante ecografía vaginal, con presencia de vesícula gestacional con latido cardíaco positivo. Se llevó a cabo un seguimiento del embarazo para confirmar su evolución hasta la semana decimosegunda y evaluar el aborto durante el primer trimestre de gestación.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS:

Una vez obtenidos los datos de fragmentación de ADN y los datos clínicos, éstos fueron remitidos al coordinador del estudio. Se llevó a cabo un análisis estadístico empleando el paquete SPSS. Las variables de estudio fueron las siguientes:

Tasa de Fecundación

Calidad Embrionaria (Criterios ASEBIR)

Tasa Embarazo positivo (β +)

Tasa Embarazo clínico.

Tasa de Implantación.

Tasa de Aborto.

RESULTADOS

Respecto al grupo de pacientes sometidos a ICSI, la edad materna media fue de 33,7 años y la paterna de 37,7. Una de las muestras no pudo ser evaluada para determinar el DFI. Del total de las 67 muestras evaluadas, el DFI medio fue del 5,8%. Sesenta muestras (89,5%) presentaron un DFI inferior al 15%, con una media de fragmentación del 3,9%, considerándose, por tanto, muestras normales. El 10,5% restante de las

muestras (n=7) fueron patológicas, con un DFI medio de un 21,9%. Como muestra la tabla I, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables de estudio.

Respecto al grupo de pacientes receptoras de ovocitos sometidas a FIV convencional, la edad materna media de las receptoras fue de 40,0 años y de las donantes de ovocitos de 25,3. Por motivos técnicos, cinco muestras no pudieron ser analizadas para determinar el DFI. Del total de las 108 muestras evaluadas, el DFI medio fue del 7,6%. Ochenta y ocho muestras (81,5%) presentaron un DFI inferior al 15%, con una media de fragmentación del 3,8%, considerándose, por tanto, muestras normales. El 18,5% restante de las muestras (n=20) fueron patológicas, con

	DFI<15	DFI≥15	PVALOR
EDAD MATERNA MEDIA	40,1	38,3	0,16
EDAD DONANTES MEDIA	25,0	26,4	0,08
MEDIA VOLUMEN EYACULADO (ML)	3,1	3,6	0,11
MEDIA RECUENTO (MILLONES/ML)	82,1	76,2	0,61
MEDIA MOVILIDAD PROGRESIVA (%)	51,6	55,2	0,19
MEDIA MOVILIDAD NO PROGRESIVA (%)	0,0	0,2	0,33
MEDIA INMÓVILES (%)	48,4	44,6	0,17
MUESTRAS CON TERATOZOOSPERMIA * (%)	40,0	25,0	0,36
NÚMERO MEDIO DE OVOCITOS INSEMINADOS	11,9	12,1	0,83
TASA DE FECUNDACIÓN (%)	70,6	59,3	0,09
MEDIA EMBRIONES TRANSFERIDOS	1,9	1,9	0,71
MEDIA EMBRIONES TIPO A TRANSFERIDOS	1,3	1,3	0,86
MEDIA EMBRIONES TIPO B TRANSFERIDOS	0,4	0,4	0,95
MEDIA EMBRIONES TIPO C TRANSFERIDOS	0,1	0,1	0,97
MEDIA EMBRIONES TIPO D TRANSFERIDOS	0,1	0,1	0,70
TASA DE BETA POSITIVA (%)	67,4	65,0	0,51
TASA DE EMBARAZO CLÍNICO (%)	53,0	47,4	0,42
TASA DE IMPLANTACIÓN (%)	34,2	26,5	0,57
TASA DE ABORTO CLÍNICO PRIMER TRIMESTRE (%)	30,2	14,3	0,36

un DFI medio de un 24,4. En la tabla II se muestran los resultados obtenidos comparando las muestras consideradas normales respecto a las patológicas.

aborto del primer trimestre en un programa de ICSI por factor masculino y en otro de FIV convencional empleando ovocitos donados.

normozoospermicos respecto al de varones con alteraciones seminales (18,5% vs 10,5%, respectivamente).

Respecto a la calidad seminal, tanto en muestras con unos parámetros alterados (tabla I), como en muestras normozoospermicas (tabla II), no encontramos diferencias significativas en el volumen, recuento, movilidad y morfología en muestras con DFI alterado respecto a muestras con DFI normal. Aunque hay varios autores que sí han encontrado un asociación entre parámetros seminales anormales y roturas en el ADN nuclear de los espermatozoides del eyaculado (Singh y cols., 1988; Gandini y cols., 2000; Irvine y cols., 2000; Zini y cols., 2001; Huang y cols., 2005), nuestros datos están en consonancia con los obtenidos por Larson-Cook y cols., (2003). Una observación interesante es que en nuestro trabajo, el 18,5% de los varones normozoospermicos y potencialmente fértiles, presentaron un DFI superior al 15%, con una media del 24,2%.

En cuanto a la relación que existe entre el DFI y la tasa de fecundación tras FIV/ICSI, los resultados encontrados son también controvertidos. Sakkas y cols., (1996), Morris y cols., (2002), Larson-Cook y cols., (2003), Virro y cols., (2004) y Henkel y cols., (2004) observaron que ambos parámetros no estaban relacionados. Sin embargo otros autores como Sun y cols., (1997), Lopes y cols., (1998) y Saleh y cols., (2003) observaron que un nivel de daño elevado en el ADN estaba asociado con una baja tasa de fecundación. Nuestros datos indican que no existe una correlación entre DFI y tasa de fecundación, tanto tras emplear ICSI, como FIV convencional. No obstante, observamos una tendencia hacia una mejor tasa de fecundación en muestras con DFI inferior a 15 tras la realización de FIV convencional ($p=0,08$, tabla II).

Respecto al desarrollo embrionario, la expresión de los genes paternos comienza cuando el embrión tiene 4-8 células. En este momento, si existen alteraciones en el ADN paterno, podrían ponerse de manifiesto, perjudicando el desarrollo embrionario. Esta circunstancia podría explicar una mayor incidencia de bloqueos embrionarios,

	DFI<15	DFI≥15	P VALOR
EDAD MATERNA	40,1	38,3	0,16
MEDIA			
EDAD DONANTES	25,0	26,4	0,08
MEDIA			
MEDIA VOLUMEN	3,1	3,6	0,11
EYACULADO (ML.)			
MEDIA RECUENTO	82,1	76,2	0,61
(MILLONES/ML.)			
MEDIA MOVILIDAD	51,6	55,2	0,19
PROGRESIVA (%)			
MEDIA MOVILIDAD	0,0	0,2	0,33
NO PROGRESIVA (%)			
MEDIA INMÓVILES	48,4	44,6	0,17
(%)			
MUESTRAS CON	40,0	25,0	0,36
TERATOZOOSPERMI			
A* (%)			
NÚMERO MEDIO DE	11,9	12,1	0,83
OVOCITOS			
INSEMINADOS			
TASA DE	70,6	59,3	0,09
FECUNDACIÓN (%)			
MEDIA EMBRIONES	1,9	1,9	0,71
TRANSFERIDOS			
MEDIA EMBRIONES	1,3	1,3	0,86
TIPO A			
TRANSFERIDOS			
MEDIA EMBRIONES	0,4	0,4	0,95
TIPO B			
TRANSFERIDOS			
MEDIA EMBRIONES	0,1	0,1	0,97
TIPO C			
TRANSFERIDOS			
MEDIA EMBRIONES	0,1	0,1	0,70
TIPO D			
TRANSFERIDOS			
TASA DE BETA	67,4	65,0	0,51
POSITIVA (%)			
TASA DE EMBARAZO	53,0	47,4	0,42
CLÍNICO (%)			
TASA DE	34,2	26,5	0,57
IMPLANTACIÓN (%)			
TASA DE ABORTO	30,2	14,3	0,36
CLÍNICO PRIMER			
TRIMESTRE (%)			

Tabla II: Resultados en el grupo de pacientes sometidos a FIV con donación de ovocitos.
* Muestras con teratozoospermias leves/moderadas que permitieron llevar a cabo el FIV convencional.

Como se observa, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables de estudio.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio no muestran ninguna relación de la fragmentación del ADN espermático (considerando una muestra patológica con un $DFI \geq 15\%$) respecto a la calidad seminal, fecundación, calidad embrionaria, tasas de gestación y

Los DFI medios obtenidos en los 2 grupos de estudio fueron del 5,8% en pacientes que van a ICSI por factor masculino y un 7,6% en varones normozoospermicos que van a FIV convencional con donación de ovocitos. Es decir, encontramos un ligero incremento de la fragmentación del ADN espermático en muestras normales respecto a muestras con una calidad seminal alterada. Además, el porcentaje de muestras patológicas también fue superior en el grupo de varones

así como ciertos fallos de implantación, embarazos bioquímicos o abortos clínicos (Seli y cols., 2004). No obstante, la implicación de la fragmentación del ADN espermático es un tema controvertido y sin una explicación demostrable. Nuestros datos nos indican que no existe ninguna relación entre la fragmentación del ADN espermático con el bloqueo en la primeras divisiones y el desarrollo embrionario hasta la fase de blastocisto (datos no mostrados). De la misma forma, tampoco encontramos una relación entre el DFI y la calidad de toda la cohorte embrionaria (datos no mostrados).

En cuanto a la fragmentación del ADN espermático y las tasas de embarazo y aborto, tampoco encontramos ninguna asociación (Tablas I y II). Los resultados publicados en la literatura también son contradictorios al respecto. Empleando la técnica SCSA, hay grupos que con un DFI superior al 27% no tuvieron embarazos tras FIV/ICSI (Larson y cols., 2000, Larson-Cook y cols., 2003; Saleh y cols., 2003). No obstante, Bungum y cols., (2004) y Payne y cols., (2005) si consiguieron embarazos con un DFI superior al 27%. Utilizando la técnica TUNEL, Benchaib y cols., (2003) no obtuvieron ningún embarazo con un DFI superior al 20%. Borini y cols., (2006) observaron que la tasa de embarazo clínico y la tasa de aborto eran significativamente diferentes entre pacientes con alta y baja fragmentación espermática en los casos de ICSI, aunque no en los de FIV, atribuyéndolo a que en FIV se produce una selección natural del espermatozoide. No obstante, Seli y cols., (2004) y Huang y cols., (2005) no encontraron ninguna relación entre la tasa de embarazo y la tasa de fragmentación del ADN espermático medido mediante TUNEL.

El empleo de diferentes técnicas de medida, las diferencias que pueden haber entre la medida de la fragmentación en semen fresco o capacitado, el número de espermatozoides analizados, el punto de corte establecido para catalogar una muestra como normal o patológica, así como todas aquellas pequeñas diferencias metodológicas y/o de diseño, hacen que los resultados

publicados no ofrezcan un valor claro desde un punto de vista clínico y que, por tanto, estemos en una situación aparentemente irreal de lo que sucede. El empleo de la técnica TUNEL parece que es la mejor para medir un daño real sobre el ADN espermático (Álvarez y Lewis, 2008). Por otra parte, empleando una alícuota de la muestra capacitada que se emplea para llevar a cabo la inseminación o la microinyección nos aproximamos más al nivel de fragmentación "real" de la muestra espermática. Aunque el tamaño de la muestra en el presente trabajo sigue siendo relativamente pequeño y tiene que incrementarse y contrastarse, los datos son claros, hablando a favor de que la medida de la fragmentación del ADN espermático no influye en los resultados tras FIV/ICSI. Es importante plantearse a partir de ahora la conveniencia de solicitar estas pruebas por parte de los clínicos. Además, los tratamientos antioxidantes enfocados para intentar disminuir la fragmentación del ADN espermático dejarían de tener validez, ya que no influyen en los resultados de las técnicas de reproducción asistida.

Finalmente, la realización de puntos de corte más altos o más bajos para considerar una muestra como normal o patológica debería tenerse en cuenta en base a los resultados obtenidos en cada laboratorio. En nuestro caso, la variación del punto de corte para equilibrar el tamaño muestral en cada grupo no supuso ningún cambio en los resultados (datos no mostrados).

BIBLIOGRAFÍA

Álvarez JG and Lewis S. Sperm chromatin structure assay parameters measured after density gradient centrifugation are not predictive of the outcome of TRA. *Letters to the editor, Hum Reprod.*, doi:10.1093/humrep/den053. Advance access publication on March 5, 2008. Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, Guérin JF.: Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod.* 2003; 18: 1023-8.

Bolmar F, Rebagliato M. Epidemiología de la Reproducción. En: J Remohí, C Simón, A Pellicer, F Bonilla-Musoles (Eds).

Reproducción Humana (2ª Ed): 45-58. McGraw-Hill Interamericana. Madrid; 2.002.

Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, Coticchio G.: Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod.* 2006; 21: 2876-81.

Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A.: The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod.* 2004; 19: 1401-8.

Collins JA, Barnhart KT, and Schlegel PN. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization. *Fertil and Steril.*, 2008; 89(4):823-31.

Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, Dondero F, Lenzi A.: Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2000;15: 830-9.

Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Gips H, Schill WB, Kruger TF.: Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril.* 2004; 81: 965-72.

Huang CC, Lin DP, Tsao HM, Cheng TC, Liu CH, Lee MS.: Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril.* 2005; 84: 130-40

Huynh T, Mollard R, Trounson A. Selected genetic factors associated with male infertility. *Hum. Reprod.*, 2002;8:183-198.

Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ.: DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl.* 2000; 21: 33-44.

Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod.* 2000 Aug; 15(8):1717-22.

Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET, Evenson DP.: Relationship between the outcomes of

assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril.* 2003; 80: 895-902.

Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF.: Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 1998; 13: 896-900.

Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1998;69(3):528-32.

Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison DR.: The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod.* 2002 ; 17: 990-8.

Payne JF, Raburn DJ, Couchman GM, Price TM, Jamison MG, Walmer DK.: Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure

assay and outcomes of assisted reproductive techniques. *Fertil Steril.* 2005; 84: 356-64.

Sakkas D, Urner F, Bianchi PG, Bizzaro D, Wagner I, Jaquenoud N, Manicardi G, Campana A: Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1996 ; 11: 837-43.

Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, Nelson DR, Thomas AJ.: Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril.* 2003; 79: 1597-605.

Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D.: Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2004; 82: 378-83.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL.: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988; 175: 184-91.

Sun JG, Jurisicova A, Casper RF.: Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization

in vitro. *Biol Reprod.* 1997; 56: 602-7.

The Practice Committee of The American Society for Reproductive Medicine. The clinical utility of sperm DNA integrity testing. *Fertil and Steril.*, 2008;90(S3):S178-S180.

Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP.: Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril.* 2004; 81: 1289-95.

World Health Organization.: Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility. *Int J. Androl*, 1987; 7: 1-53.

Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT.: Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril.* 2001;75 :674-7.

USO DE MICROARRAYS EN DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL.

Carles Giménez

Reprogenetics Spain, S.A. Barcelona.pgdteam@reprogenetics.es

INTRODUCCIÓN:

La mayoría de los ciclos de fecundación in vitro (FIV) conllevan la transferencia de más de un embrión -el 85.3% de los ciclos de FIV, FIV-ICSI o FIV+ICSI según el último registro de la Sociedad Española de Fertilidad en referencia a datos de 2006. Aunque esta práctica, la transferencia de más de un embrión, incrementa las posibilidades de conseguir un embarazo, también aumenta el riesgo de embarazos múltiples, los cuales, están asociados a un aumento del riesgo de complicaciones durante el embarazo como la pre-eclampsia, histerectomía, bajo peso al nacer o malformaciones congénitas, entre otras (Stromberg et al., 2002; Pinborg et al., 2003; Walker et al., 2004).

La tendencia actual para evitar las complicaciones derivadas de los embarazos múltiples es la disminución del número de embriones a transferir. De hecho, las recomendaciones de la European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) apuestan por la transferencia de un solo embrión (Magli et al., 2008). Sin embargo, la transferencia de un único embrión comporta un descenso en la tasa de embarazo. Para evitar ese descenso, es preciso diseñar estrategias que permitan la selección del embrión con mayor potencial de implantación.

Hasta el momento, la estrategia seguida es definir que criterios morfológicos permiten determinar el embrión de toda la cohorte con mayores posibilidades de dar lugar a un embarazo que llegue a término (Sakkas and Gardner, 2005). En este sentido nuestra asociación redactó unos criterios de valoración morfológica con la finalidad de homogenizar la categorización de la descripción morfológica y unificar el criterio en el momento de seleccionar que embrión transferir (ASEBIR, 2008).

No obstante, a pesar de las estrictas valoraciones morfológicas, muchos embriones morfológicamente "normales" no dan lugar a un embarazo o abortan de forma espontánea después de la implantación. Aunque en muchos casos no sabemos porque, en otros, la ausencia de implantación y los abortos pueden explicarse por la presencia de anomalías cromosómicas numéricas, es decir, por el fenómeno conocido como aneuploidía.

Una elevada proporción de los ovocitos y embriones provenientes de ciclos de fecundación in vitro (FIV) presentan anomalías cromosómicas (Angell et al., 1983; Delhanty et al., 1993; Munné et al., 1993; Munné et al., 1995; Gutiérrez-Mateo et al., 2004)(tabla 1). Además, sabemos que la mitad de los abortos de primer trimestre presentan anomalías cromosómicas (Hassold and Jacobs, 1984).

La mayoría de las anomalías cromosómicas son letales, por lo que el embrión no llegará a implantar o, si lo hace, dará lugar a una pérdida de embarazo. Parece lógico pensar que evitando la transferencia de estos embriones las tasas de embarazo y, sobretodo, las de niño en casa, mejoren, y la de abortos, disminuya. El problema reside en que los embriones aneuploides no pueden diferenciarse de los euploides mediante la observación morfológica. La única opción real en estos momentos es el diagnóstico genético preimplantacional (DGP).

Aunque el análisis de aneuploidías en embriones preimplantacionales mediante protocolos óptimos de hibridación in situ fluorescente (FISH) ha ofrecido excelentes resultados en pacientes correctamente indicadas (Gianaroli et al., 1999; Munné et al., 1999, 2003, 2005; Schoolcraft et al., 2008; Rubio et al., 2009), esta metodología presenta dos limitaciones técnicas. En primer lugar disponemos de un número limitado de fluorocromos, por lo que el número de cromosomas analizables en una sola hibridación es pequeño y para poder analizar un número aceptable de cromosomas (al menos 8) deben realizarse varias rondas de hibridación. Los protocolos más completos analizan entre 9 y 12 cromosomas, por lo que inevitablemente quedará un determinado porcentaje de

Edad	20-34	35-39	40-42
Aneuploidía (9 cr)	24%	27%	39% ^a
Otras aneuploidías (mediante CGH)*	5%	6%	8% ^b
Anomalías post meióticas**	35%	36%	35% ^c
Total anomalías	64%	69%	82%^d

a,d: p<0.001; b: desc; c: NS

Munné et al, 1995 ; Márquez et al., 2000 ; *Gutiérrez-Mateo et al., 2004

Tabla 1: Porcentaje de embriones cromosómicamente anormales en función de la edad.

aneuploidía sin detectar. En segundo lugar, la FISH es dependiente de cómo se haya realizado la fijación. No todas las técnicas de fijación permiten obtener núcleos interfásicos en condiciones óptimas y en función de la morfología del núcleo, de su tamaño y/o de la presencia de citoplasma la FISH puede verse comprometida.

La aparición en 1992 de la hibridación genómica comparada (CGH), descrita por Kallioniemi (Kallioniemi et al., 1992), que permitía la detección de ganancias y pérdidas de material genético en tumores sólidos, ha permitido, previa evolución del protocolo (Wells and Delhanty, 1996), el análisis de todo el complemento cromosómico. Así, la CGH ha permitido

normal) marcadas con fluorocromos diferentes (verde y rojo, respectivamente), contra metafases normales (46,XX o 46,XY). Sobre los cromosomas de las metafases hibridarán tantos fragmentos del DNA muestra como del de referencia (figura 1). La proporción de fluorescencia verde:rojo a lo largo de cada cromosoma nos proporcionará el número de copias presentes en la muestra, de manera que una desproporción a favor del fluorocromo de color verde en un cromosoma determinado, nos indicará de la presencia de más copias de ese cromosoma en la muestra, mientras que si la desproporción es a favor del color rojo, nos indicará una pérdida para ese cromosoma.

D+3, aunque esta aproximación no permite determinar las anomalías acaecidas en meiosis II, las de origen paterno ni las postzigóticas. Recientemente se han conseguido embarazos mediante el análisis combinado de aneuploidía en primer corpúsculo polar junto con DGP para enfermedad monogénica en D+3 (Obradors et al., 2008).

Los datos más recientes de aplicación de la CGH en reproducción asistida los han aportado la colaboración entre Reprogenetics y el Colorado Center for Reproductive Medicine. Utilizando la CGH como herramienta diagnóstica y la biopsia de blastocisto junto con la vitrificación del embrión biopsiado en pacientes con fallos de implantación, se ha conseguido una tasa de embarazo del 85% con una tasa de implantación del 66% (Wells et al., 2008; comunicación personal).

Pero lo más importante es lo que la CGH nos ha enseñado (Wells and Delhanty, 2000; Voullaire et al., 2002; Wilton et al., 2003):

- 1) la aneuploidía puede afectar, y afecta, a cualquier cromosoma durante el desarrollo preimplantacional;
- 2) aún así, no todos los cromosomas tienen el mismo riesgo de aneuploidía;
- 3) se han detectado anomalías en cromosomas para los que nunca se había observado aneuploidía en diagnóstico prenatal o en material abortivo por lo que se presume que causan bloqueo del desarrollo embrionario preimplantacional, fallo de implantación o abortos tempranos;
- 4) se han detectado roturas cromosómicas no detectables mediante FISH;
- 5) entre el 20-40% de los embriones son portadores de anomalías cromosómicas no detectables mediante los kits de FISH comerciales.

Pero la CGH presenta algunas desventajas. Precisa de un largo periodo de tiempo para obtener resultados, lo cual la hace incompatible con la transferencia en D+3/D+5. Los



Figura 1: Metafase tras CGH (foto: Dra. Fragouli©, publicada en Hum Reprod 2008; 23:2596-2608)

solventar los dos principales problemas de la FISH. Por una parte, no se precisa de la fijación celular, las células se manipulan como si se tratará de un DGP de enfermedad monogénica, introduciéndolas en un tubo de PCR; por otro, se analizan todos los cromosomas.

La técnica utiliza la hibridación competitiva de dos fuentes de DNA (uno, la muestra que queremos analizar; dos, DNA de referencia cromosómicamente

Las primeras aplicaciones de la CGH en reproducción humana datan de 2001 cuando el equipo de la Dra Wilton (Wilton et al., 2001) consiguió un embarazo tras biopsia embrionaria en D+3, congelación, análisis mediante CGH, descongelación del embrión normal y transferencia. Otras aproximaciones han sido descritas por otros autores, como la biopsia de primer corpúsculo polar (Wells et al, 2002) análisis mediante CGH y transferencia en

embriones biopsiados necesitan ser congelados, aunque la aparición de la técnica de vitrificación está facilitando mucho este proceso y arrojan un muy buen rendimiento del proceso con una supervivencia en algunos casos superior al 90%. Recientemente se ha presentado una modificación de la metodología que permitiría una reducción en el tiempo necesario para obtener resultado (Rius et al, 2009), lo cual permitiría la transferencia dentro del mismo ciclo. Aún así, las principales desventajas de la CGH es que se trata de una técnica extremadamente compleja y el análisis de resultados es extraordinariamente lento, lo que la convierte en una metodología de difícil uso rutinario en la práctica clínica.

En estos momentos, existe la posibilidad del uso de los "chips" o "microarrays", como alternativa para la obtención de un diagnóstico de todo el complemento cromosómico en un espacio de tiempo compatible con la transferencia en fresco si así se quiere. La mayoría de las diferentes plataformas de microarrays están basadas en una hibridación competitiva de un DNA muestra y un DNA de referencia marcados con fluorocromos diferentes. La diferencia estriba sobre "que" se hacen hibridar (BAC's, oligos, librerías, SNP's). La ventaja de los microarrays sobre la CGH convencional, es que la lectura de la fluorescencia es simple y rápida y que el tiempo de hibridación es generalmente menor.

El primer obstáculo que se debe sortear antes de proceder al uso de los microarrays es la amplificación total del genoma (WGA) previa al marcaje del DNA. Diferentes métodos se utilizan para llevar a cabo la WGA: PEP PCR, DOP PCR, MDA, GenomePlex. Sólo una buena y homogénea amplificación del genoma junto con una reducida tasa de "allele drop out" (ADO) permitirá obtener buenos resultados con los microarrays. Por este motivo es preciso una extensiva validación del proceso previa a la aplicación de la metodología de microarrays.

CGH MICROARRAYS DE BAC'S:

La plataforma sobre la que se hace hibridar el DNA de la muestra y el test, la

constituyen "puntos" formados por clones de cromosomas artificiales de bacteria (BAC) de tamaño relativamente grande (150-200Kb) que cubren la total longitud de cada uno de los cromosomas (ver figura 2). Sobre cada uno de estos

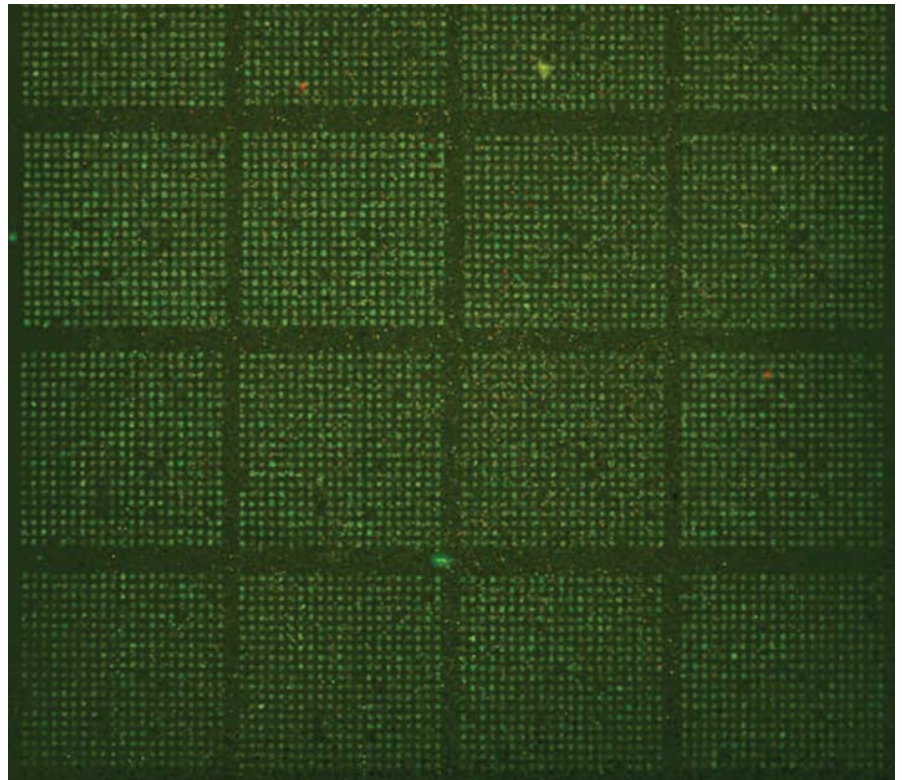


Figura 2: imagen de un array de BAC's después de la hibridación.

puntos hibridan un gran número de fragmentos del DNA muestra y referencia. El annealing de múltiples fragmentos derivados de la misma región del cromosoma sobre el mismo punto, reduce el efecto que puedan tener los artefactos técnicos creados por posibles amplificaciones preferenciales y el ADO. Como en cada punto hibridan centenares o miles de fragmentos amplificados, el hecho de que unos pocos fragmentos no se hayan amplificado queda diluido por la gran cantidad de otros que sí se han adherido a la sonda. De todas formas, el diagnóstico no se puede basar en el resultado obtenido en un solo BAC, sino que se obtiene combinando resultado de varias sondas adyacentes (Figura 3). Esto disminuye la resolución de los arrays de BAC's.

CGH MICROARRAYS DE LIBRERÍAS CROMOSÓMICAS:

En este tipo de plataforma, el DNA muestra y el test, se hacen hibridar

sobre sondas fabricadas a partir de la amplificación al azar de regiones cromosómicas obtenidas por microdissección o citometría de flujo de cada uno de los cromosomas. El resultado es un chip en el que cada

punto está compuesto por una mezcla muy heterogénea de fragmentos de DNA derivados de múltiples sitios a lo largo de cada cromosoma (Hu et al., 2004).

CGH MICROARRAYS DE OLIGOS:

La base de esta plataforma son pequeñas sondas de entre 25 y 85 nucleótidos sintetizadas directamente en la base sólida del microarray y sobre las que se hará hibridar el DNA muestra y el test. Esta plataforma ha sido probada para la detección de aneuploidía en células únicas provenientes de líneas linfoblásticas, en fibroblastos y en blastómeros (LeCaignec et al., 2006). Con posterioridad se ha aplicado clínicamente en el DGP para análisis de aneuploidías resultando en varios embarazos (Hellani et al., 2008).

Los arrays de oligos tienen la desventaja de que el pequeño tamaño de las sondas aumenta el riesgo de observar ganancias y/o pérdidas artefactuales introducidos

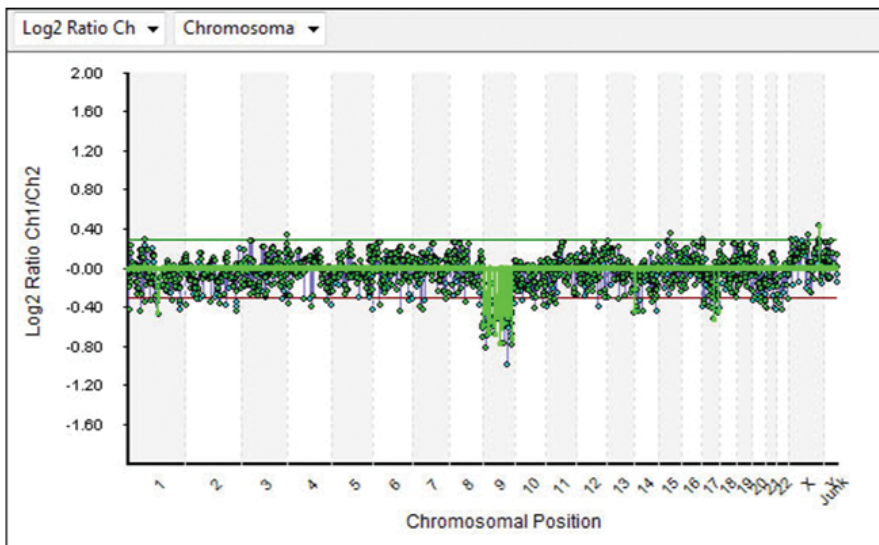


Figura 3: Resultado de un aCGH procedente del análisis de un blastómero presentando una monosomía para el cromosoma 9

durante la WGA. Se puede aumentar el número de sondas con la finalidad de diluir estos artefactos, pero entonces el coste aumenta.

SNP's microarrays: Plataforma basada en el análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's) distribuidos al azar a lo largo de todo el genoma y presentes en gran número. Este tipo de microarray difiere ligeramente en relación a los arrays basados en CGH. El DNA muestra y el de referencia no se combinan, sino que se hibridan por separado y se valoran en paralelo, por este motivo pueden tener el mismo marcaje. La valoración se realiza por dos métodos. El primero consiste en reconocer que cromosomas se han heredado de los progenitores a través de los haplotipos obtenidos. Si se observan tres haplotipos, dos de ellos correspondiendo a un mismo progenitor, sabremos que se trata de una trisomía. El segundo consiste en comparar la intensidad del marcaje obtenido del DNA muestra y el de referencia, si para unas sondas en concreto se observa mayor brillo del DNA de referencia, pensaremos que hay una monosomía en el DNA muestra.

Este tipo de plataforma presenta algún problema en relación a la detección de la trisomía, ya que no todas estas se derivan de una no disyunción en meiosis 1, por lo que en caso de producirse en meiosis 2 la diferenciación solo se podría llevar a cabo por intensidad de marcaje, pero no por haplotipo, y no hay suficientes datos sobre la fiabilidad del

método basándose solo en intensidad.

Numerosos grupos utilizan este tipo de plataforma (Treff et al, 2007, 2009; Handyside et al, 2008; Kearns et al 2008; Rabinowitz et al, 2008; Scott et al, 2008), que entre otras, tiene la ventaja que permite obtener una huella digital de cada embrión, de manera que puede monitorizarse que embrión ha implantado por ejemplo, o se podría llegar a realizar un diagnóstico indirecto de una enfermedad monogénica sin necesidad de desarrollar un protocolo específico para cada pareja.

La desventaja del array de SNP's es la falta de exactitud a nivel de un SNP y el alto coste.

Tal y como se ha comentado anteriormente el uso conjunto de CGH, biopsia de blastocisto y vitrificación de embriones en un programa de FIV ha resultado en un espectacular aumento de la tasa de implantación hasta valores cercanos al 66% y de embarazo a término con un 78%. Estos son datos preliminares de unos 128 ciclos llevados a cabo por Reprogenetics en colaboración con el centro de FIV de Colorado liderado por el Dr. William Schoolcraft y considerado uno de los mejores centros en el mundo. Pero este protocolo precisa del cultivo embrionario hasta el estadio de blastocisto, por lo que era necesario disponer de alguna otra herramienta que permitiera el mismo tipo de análisis en cualquier estadio celular y compatible

con la transferencia dentro del mismo ciclo.

El uso de los microarrays de BAC's basados en la técnica de CGH (aCGH) nos ha permitido examinar todos los cromosomas en 24-30 horas de la recepción de la muestra, siendo la obtención de resultados compatible con la transferencia dentro del mismo ciclo de FIV.

En los estudios de validación que hemos llevado a cabo en Reprogenetics, hemos podido observar como este nuevo procedimiento detecta un 20% más de aneuploidías que la FISH con 12 sondas.

Aunque teóricamente la aCGH puede detectar pequeñas deleciones y/o amplificaciones de regiones de DNA, este aspecto está en proceso de validación por lo que por el momento estamos utilizando los aCGH para detectar únicamente anomalías cromosómicas numéricas. De todas formas, los aCGH que estamos utilizando están diseñados para la detección de la ganancia o pérdida de todo un cromosoma y no se valora ningún polimorfismo de número de copia (CNP), ni ningún rasgo fenotípico, ni ningún resultado que pudiera ser éticamente cuestionable (como enfermedades de aparición tardía, predisposición al cáncer, ...) así como tampoco desequilibrios de significado incierto.

Mediante los aCGH no es posible detectar cambios en la ploidía del embrión. Los embriones haploides no se desarrollan hasta blastocisto, por lo que difícilmente darán lugar a error.

En cuanto a los embriones poliploides, aquéllos que provienen de cigotos 3PN deberían ser detectados por los embriólogos y descartados. Otra fuente de poliploidía es la proveniente de espermatozoides diploides u ovocitos diploides. Los ovocitos diploides son gigantes y no deberían utilizarse, mientras que un 1% de los espermatozoides son diploides. Habitualmente son megalocéfálicos y no se utilizan al hacer ICSI, pero podrían fecundar en FIV convencional. Los aCGH no detectan este tipo de poliploidía. Finalmente, un 5% de cigotos 2PN pueden dar lugar a poliploidía por

endoreduplicación y ausencia de citocinesis. La mayoría de estos embriones poliploides tendrán otras anomalías cromosómicas detectables mediante aCGH. Sólo un 1% de las células poliploides provenientes de cigotos 2PN son poliploides puras y no pueden ser detectadas mediante aCGH (ni por cualquier otro tipo de array).

A falta de incrementar el número de casos clínicos, esperamos obtener resultados equiparables a los obtenidos mediante la CGH convencional.

AGRADECIMIENTOS:

Expresar mi agradecimiento a todo el equipo de Reprogenetics y muy especialmente al Dr. Dagan Wells, sin la aportación del cual no habría podido escribir este trabajo.

REFERENCIAS.

- Angell RR, Aitken RJ, van Look PF, Lumsden MA, Templeton AA. Chromosome abnormalities in human embryos after in vitro fertilization. *Nature* 1983; 303:336–338.
- ASEBIR. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos (2a edición). 2008.
- Delhanty JD, Griffin DK, Handyside AH, Harper J, Atkinson GH, Pieters MH, Winston RM. Detection of aneuploidy and chromosomal mosaicism in human embryos during preimplantation sex determination by fluorescent in situ hybridisation, (FISH). *Hum Mol Genet* 1993; 2:1183–1185.
- Gianaroli L, Magli C, Ferraretti AP, Munné S. Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in-vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil Steril* 1999; 72:837–844.
- Gutiérrez-Mateo C, Benet J, Wells D, Colls P, Bermúdez MG, Sánchez-García JF, et al. Aneuploidy study of human oocytes first polar body comparative genomic hybridization and metaphase II fluorescence in situ hybridization analysis. *Hum Reprod* 2004; 19:2859–2868.
- Handyside AH, Thornhill AR, Affara NA, Harton GL, Mariani BD, Griffin DK. Recombination mapping: a universal molecular karyotyping method for preimplantation genetic diagnosis of inherited disease. *Fertil Steril* 2008; 90(Suppl 1):S24.
- Hassold TJ, Jacobs PA. Trisomy in man. *Annu Rev Genet.* 1984; 18:69–97.
- Hu DG, Webb G, Hussey N. Aneuploidy detection in single cells using DNA array-based comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod* 2004; 10:283–289.
- Kearns WG, Pen R, Benner A, Kittai A, Widra E, Leach R. SNP microarray genetic analyses to determine 23-chromosome ploidy, structural chromosome aberrations and genome-wide scans to identify disease risks from a single embryonic cell. *Fertil Steril* 2008; 90(Suppl 1):S23.
- Magli MC, Van den Abbeel E, Lundin K, Royere D, Van der Elst J. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories. *Hum Reprod* 2008; 23: 1253–1262.
- Márquez C, Sandalinas M, Bahçe M, Alikani M, Munné S. Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reproductive Biomedicine Online* 2000; 1:17–27.
- Munné S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1993; 8:2185–2191.
- Munné S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. Embryo morphology, developmental rates and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 1995; 64:382–391.
- Munné S, Magli C, Cohen J, Morton P, Sadowy S, Gianaroli L, et al. Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. *Human Reprod* 1999; 14:2191–2199.
- Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Velilla E, Walmsley R, Sadowy S, et al. Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online* 2003; 7:91–97.
- Munné S, Chen S, Fischer J, Colls P, Zheng X, Stevens J, et al. Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages. *Fertil Steril* 2005; 84:331–335.
- Obradors A, Fernández E, Oliver-Bonet M, Rius M, de la Fuente A, Wells D, et al. Birth of a healthy boy after a double factor PGD in a couple carrying a genetic disease and at risk for aneuploidy: case report. *Hum Reprod* 2008; 23:1949–1956.
- Pinborg A, Loft A, Schmidt L, Andersen AN. Morbidity in a Danish national cohort of 472 IVF/ICSI twins, 1132 non-IVF/ICSI twins and 634 IVF/ICSI singletons: health-related and social implications for the children and their families. *Hum Reprod* 2003; 18:1234–1243.
- Rabinowitz M, Johnson DS, Salzman J, Banjevic M, Cinnioglu C, Behr B. Reliable concurrent calling of multiple genetic alleles and 24-chromosome ploidy without embryo freezing using Parental Support TM technology (PS). *Fertil Steril* 2008; 90(Suppl 1):S23.
- Rius M, Obradors A, Daina G, Cuzzi J, Marqués L, Calderón G, et al. Reliability of 12 hours comparative genomic hybridization in fibroblasts and blastomeres for a comprehensive aneuploidy screening. Abstracts of the 25th Annual Meeting of ESHRE: 0–275.
- Rubio C, Buendía P, Rodrigo L, Mercader A, Mateu E, Peinado V, et al. Prognostic factors for preimplantation genetic screening in repeated pregnancy loss. *Reprod Biomed Online* 2009; 18:687–693.
- Sakkas D, Gardner DK. Noninvasive methods to assess embryo quality. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005; 17:283–288.
- Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG, Stevens J, Rawlins M, Munne S. Preimplantation aneuploidy testing for infertile patients of advanced maternal age: a randomized prospective trial. *Fertil Steril* 2008; 8.
- Scott RT, Miller KA, Olivares R, Su J, Fratherelli JL, Treff NR. Microarray based 24 chromosome preimplantation genetic diagnosis (mPGD) is highly predictive of the reproductive potential of human embryos: a prospective blinded non-selection trial. *Fertil Steril* 2008; 90(Suppl 1):S22–S23.
- Sociedad Española de Fertilidad. Registro FIV-ICSI de la Sociedad Española de Fertilidad. Año 2006.

Stromberg B, Dahlquist G, Ericson A, Finnstrom O, Koster M, Stjernqvist K. Neurological sequelae in children born after in-vitro fertilisation: a population-based study. *Lancet* 2002; 359:461-465.

Treff NR, Su J, Mavrianos J, Bergh PA, Miller KA, Scott RT. Accurate 23 chromosome aneuploidy screening in human blastomeres using single nucleotide polymorphism (SNP) microarrays. *Fertil Steril* 2007; 88:S1.

Treff NR, Su J, Tao X, Miller KA, Levy B, Scott RT. A novel single-cell DNA fingerprinting method successfully distinguishes sibling human embryos. *Fertil Steril* 2009; In Press

Voullaire L, Wilton L, McBain J, Callaghan T, Williamson R. Chromosome abnormalities identified by comparative genomic hybridization in embryos from women with repeated implantation failure. *Mol Hum Reprod* 2002; 8:1035-1041.

Walker MC, Murphy KE, Pan S, Yang Q, Wen SW. Adverse maternal outcomes in

multifetal pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 2004; 111:1294-1296.

Wells D, Delhanty J. Evaluating comparative genomic hybridisation (CGH) as a strategy for preimplantation diagnosis of unbalanced chromosome complements. *Eur J Hum Genet* 1996; 4(Suppl 1):125.

Wells D, Sherlock JK, Handyside AH, Delhanty JD. Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nucleic Acids Res* 1999; 27:1214-1218.

Wells D, Delhanty JD. Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod* 2000; 6:1055-1062.

Wells D, Escudero T, Levy B, Hirschhorn K, Delhanty JD, Munné S. First clinical application of comparative genomic

hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertil Steril* 2002; 78:543-549.

Wells D, Fragouli E, Stevens J, Munne S, Schoolcraft W, Katz-Jaffe M. High pregnancy rate after comprehensive chromosomal screening of blastocysts. *Fertil Steril* 2008; 90:S80.

Wilton L, Williamson R, McBain J, Edgar D, Voullaire L. Birth of a healthy infant after preimplantation confirmation of euploidy by comparative genomic hybridization. *N Engl J Med* 2001; 345:1537-1541.

Wilton L, Voullaire L, Sargeant P, Williamson R, McBain J. Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure. *Fertil Steril* 2003; 80:860-868.

¿QUÉ NOS APORTA EL ESTUDIO DE FISH EN ESPERMATOZOIDES EN EL ESTUDIO DE LA PAREJA INFÉRIL?

Joan Blanco, Zaida Sarrate, Ester Anton, Lydia Garcia-Quevedo, Òscar Molina, Francesca Vidal
Unitat de Biologia Cel·lular. Facultat de Biociències. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès)
E-mail: joan.blanco@uab.cat

RESUMEN

Los estudios citogenéticos mediante FISH en espermatozoides forman parte de la mayoría de protocolos de estudio de la infertilidad masculina. La técnica permite obtener datos fidedignos sobre la frecuencia de anomalías cromosómicas en los espermatozoides ofreciendo una información valiosa en el consejo genético reproductivo. Algunos autores recomiendan un análisis de FISH en espermatozoides si el varón pertenece a un grupo de riesgo: pacientes candidatos a presentar un riesgo incrementado de transmisión de anomalías cromosómicas a su descendencia.

En este artículo se revisan los resultados obtenidos a partir de la aplicación de las metodologías de FISH en espermatozoides de individuos infértiles de cariotipo normal o alterado y su posible implicación en el consejo genético reproductivo.

INTRODUCCIÓN

En humanos genética y reproducción presentan lazos de unión muy estrechos. Estos dos conceptos convergen de manera evidente durante la gametogénesis. Disfunciones o anomalías que afecten una o más etapas implicadas en la formación de

espermatozoides u ovocitos puede repercutir en la capacidad reproductiva de los individuos afectados. En este sentido, la infertilidad se ha asociado a la presencia de anomalías genéticas, pero también a disfunciones hormonales, a edad avanzada, a obesidad, a infecciones víricas o bacterianas, a problemas inmunológicos,

psicológicos, entre otros (Maduro et al. 2003).

La contribución genética a problemas de fertilidad es difícil de valorar. Hoy en día conocemos genotipos en los cuales podemos establecer claramente el tipo de alteración que producen y sus efectos en la capacidad reproductiva de los

individuos afectos. En general, la manifestación fenotípica de la infertilidad de origen genético implica una reducción significativa de la cantidad de gametos formados, problemas en el desarrollo del embrión o incrementos del riesgo de abortos espontáneos. Diversos autores responsabilizan directamente a la genética del 15% de los casos de infertilidad humana. No obstante, si a este porcentaje le sumamos los efectos indirectos de la genética y la más que probable implicación en los casos de infertilidad de etiología desconocida, nos podemos hacer una idea de los enormes condicionamientos genéticos que presenta la reproducción en humanos.

El desarrollo de las técnicas de reproducción asistida ha permitido el acceso a la maternidad / paternidad en parejas con problemas graves de fertilidad. Algunos investigadores cuestionan las técnicas de reproducción asistida, en el sentido de que éstas permiten superar las barreras biológicas naturales y por tanto la reproducción de una población de individuos que en condiciones "normales" no podrían tener descendencia. Una situación que podría provocar un incremento de anomalías en la población de individuos concebida mediante estos procedimientos. En este contexto, el conocimiento del origen de las anomalías, su incidencia y sobre todo el riesgo de transmisión a la descendencia, es indispensable en el consejo genético reproductivo ofrecido a los individuos afectos. Este hecho queda claramente reflejado en las disposiciones generales de la Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida, donde se cita entre los objetivos de la ley (Artículo 1): Regular la aplicación de las técnicas de reproducción humana asistida en la prevención y tratamiento de enfermedades de origen genético, siempre que existan las garantías diagnósticas y terapéuticas suficientes y sean debidamente autorizadas en los términos previstos en esta Ley.

En consecuencia, las técnicas de análisis genético forman parte de la mayoría de protocolos de estudio de la infertilidad, siendo de gran importancia para el

consejo reproductivo de las parejas afectadas. Destacamos tres ámbitos de análisis: Linfocitos de sangre periférica, células germinales masculinas (metafases I y espermatozoides) y embriones en estadios preimplantacionales.

El análisis del cariotipo forma parte de la evaluación básica de la infertilidad masculina, observándose que la incidencia de anomalías cromosómicas en poblaciones de individuos infértiles es claramente superior a la descrita en la población general (de Braekeleer y Dao 1991). Los estudios meióticos en biopsia testicular, dirigidos a la detección de anomalías que afectan exclusivamente a la línea germinal, han mostrado que alrededor del 6% de los pacientes con cariotipo somático normal que consultan por infertilidad presentan alteraciones meióticas (Egozcue et al. 2000). Las anomalías del cariotipo somático o meiótico pueden afectar el grado de fertilidad de un individuo de diversas formas: reducción significativa del número de gametos, incremento en la producción de gametos portadores de anomalías cromosómicas o formación de embriones con anomalías cromosómicas.

En la detección de espermatozoides portadores de anomalías cromosómicas, hoy en día se está aplicando la metodología de la hibridación in situ fluorescente (FISH). La técnica, conocida comúnmente como FISH en espermatozoides, consiste en la utilización de sondas de DNA específicas que reconocen determinados cromosomas. Las sondas de DNA están marcadas con diferentes fluorocromos. Mediante el microscopio de fluorescencia podemos inferir el genotipo de cada espermatozoide a partir del número, el color y la distribución de las señales de hibridación presentes en cada célula.

Algunos autores recomiendan estudios de FISH en espermatozoides si el varón pertenece a un grupo de riesgo, es decir, pacientes que presentan un riesgo incrementado de transmitir una anomalía cromosómica a la descendencia. En este sentido, la técnica se ha incorporado como herramienta diagnóstica en los protocolos de estudio de la infertilidad masculina. No obstante, los estudios publicados

evidencian una extremada variabilidad (Sarrate et al. 2005), que ha provocado que algunos autores se cuestionen la validez de la técnica como herramienta diagnóstica (Foresta et al. 2002; Griffin et al. 2003).

En este artículo se revisan los resultados obtenidos a partir de la aplicación de las metodologías de FISH en la caracterización citogenética de los espermatozoides en tres grupos de individuos: 1) portadores de variantes cromosómicas estructurales 2) portadores de anomalías numéricas de los cromosomas sexuales, y 3) individuos infértiles de cariotipo normal.

Para cada uno de ellos se detallará el comportamiento de los cromosomas implicados en las anomalías a lo largo del proceso meiótico, el riesgo de transmisión para la descendencia y las posibles implicaciones en el consejo reproductivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VARONES PORTADORES DE VARIANTES CROMOSÓMICAS ESTRUCTURALES

En un sentido amplio, una variante cromosómica estructural consiste en un reordenamiento de la disposición lineal de los genes sobre los cromosomas. El reordenamiento no suele alterar la función génica, es decir, la mayoría de los individuos portadores no presentan alteraciones fenotípicas de consideración. No obstante, la presencia de segmentos cromosómicos reorganizados condiciona el proceso meiótico. Durante la primera división meiótica, estos segmentos tienden a formar estructuras que permiten el apareamiento de los segmentos homólogos. Estas estructuras son características de cada tipo de reorganización y dan lugar a patrones de segregación característicos que, en numerosas ocasiones, conducen a la formación de espermatozoides portadores de anomalías.

Mediante FISH en espermatozoides es posible realizar estudios de segregación en portadores de translocaciones recíprocas, translocaciones Robertsonianas e

inversiones (pericéntricas y paracéntricas). En portadores de inversiones la frecuencia de espermatozoides anormales varía en función del tamaño de la región implicada, oscilando entre el 0,7% y el 54,3% (Sarrate et al. 2005). Para los individuos portadores de translocaciones Robertsonianas los espermatozoides anormales producidos oscilan entre el 7% y el 36% y en portadores de translocaciones recíprocas entre el 29,4% y el 70,2% (Sarrate et al. 2005). Entre los diferentes factores que condicionan la segregación destacan los cromosomas implicados en la reorganización y las características de las regiones involucradas.

No obstante, en no pocas ocasiones la aproximación experimental y el modo de presentar y discutir los resultados plantea algunos interrogantes, cuestionando la asignación de la variabilidad a las características de la reorganización en exclusiva, y abriendo la puerta a otras posibilidades. En nuestro laboratorio hemos realizado estudios de segregación en individuos portadores con el objetivo de determinar, en un mismo laboratorio y con criterios de análisis estandarizados, el origen de la variabilidad publicada. Se han analizado un total de 23 individuos: 11 translocaciones recíprocas, 7 translocaciones Robertsonianas y 5 inversiones. Los resultados muestran un comportamiento meiótico similar para cada tipo de reorganización: En portadores de translocaciones recíprocas la media de espermatozoides normales fue del $46.5 \pm 7.4\%$, presentando la mayoría de los individuos (9/11) un patrón de segregación homogéneo (Anton et al. 2006). Todos los individuos portadores de translocaciones Robertsonianas presentaron resultados similares, con una producción media del $86.5 \pm 2\%$ de gametos normales (Anton et al. 2004). Finalmente la segregación en inversiones mostró una relación directa con el tamaño de la región invertida y su proporción relativa respecto el cromosoma (Anton et al. 2005).

Por otro lado, la presencia de reorganizaciones estructurales puede causar un efecto intercromosómico (ICE) caracterizado por un comportamiento

anormal de uno o más cromosomas no involucrados en la reorganización. La interacción de regiones asinápticas de algunos segmentos reorganizados con otros cromosomas es el mecanismo propuesto para explicar este fenómeno. Diversos estudios de FISH donde se ha valorado este fenómeno muestran un ICE positivo en el 38,5% de las translocaciones Robertsonianas estudiadas y de alrededor de un 34,5% en las translocaciones recíprocas manifestándose en forma de incrementos significativos de anomalías cromosómicas numéricas en espermatozoides de los individuos portadores (Sarrate et al. 2005).

La situación descrita en los párrafos anteriores limita la utilidad de los estudios de segregación en dos ámbitos: en portadores de translocaciones recíprocas en los cuales las características de la reorganización precisa un estudio concreto (por ejemplo aquellas en las que participan cromosomas acrocéntricos), y en inversiones donde el tamaño de la región invertida afecta el 40-50% del cromosoma. Para otro tipo de reorganizaciones los resultados publicados ponen de manifiesto una clara homogeneidad, pudiendo realizar un consejo genético preciso sin necesidad de un análisis particular.

Finalmente, debido a la susceptibilidad de los individuos portadores de reorganizaciones estructurales en producir espermatozoides aneuploides o diploides, un screening de anomalías es una opción recomendable.

VARONES PORTADORES DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS NUMÉRICAS

Las anomalías numéricas para los cromosomas sexuales son las alteraciones más frecuentes en pacientes portadores de anomalías cromosómicas que consultan por infertilidad (de Braekeleer y Dao 1991). La presencia de líneas celulares 47,XXY origina el síndrome de Klinefelter. Generalmente se asocia con diversos grados de bloqueo meiótico y la esterilidad de los individuos afectados. Los hombres de cariotipo 47,XXY presentan un grado de fertilidad muy variable; el número de espermatozoides oscila entre normozoospermia y azoospermia.

Estudios de FISH realizados en espermatozoides muestran un incremento en la incidencia de espermatozoides con disomías para los cromosomas sexuales en más del 80% de los individuos analizados (Sarrate et al. 2005). En individuos Klinefelter aparentemente no mosaicos, la incidencia media es del 6,3% (rango 1,4-25%), mientras que en individuos mosaicos 46,XY/47,XXY es del 2,5% (rango 0-7%). Finalmente un 3,7% (rango 0,1-14,4%) de los espermatozoides analizados en individuos 47,XXY presentan un cromosoma sexual extra. En individuos control, la incidencia de disomías para estos cromosomas se sitúa alrededor del 0,3%.

Cabe remarcar que tanto los individuos Klinefelter como la mayoría de los individuos 47,XXY son mosaicos en línea germinal, es decir, coexisten dos líneas celulares, una aneuploide (47,XXY o 47,XXY) y otra de cariotipo normal 46,XY. Aunque en estos pacientes el riesgo genético teórico se había asociado a la entrada a meiosis de las líneas aneuploides, estudios más recientes indican la imposibilidad de que estas células inicien la meiosis (Mroz et al. 1998; Blanco et al. 2001). Los espermatozoides de constitución cromosómica anormal producidos por estos individuos derivarían de la línea celular euploide 46,XY inmersa en un microambiente testicular anormal que afectaría la segregación cromosómica

En nuestra opinión, la elevada variabilidad en los incrementos que muestran los estudios publicados justifica un análisis de FISH en espermatozoides para cada caso en particular. A modo de ejemplo, es evidente que en un paciente 47,XXY que presente una incidencia del 21,7% de disomías para los cromosomas sexuales (Estop et al. 1998), el consejo reproductivo será muy diferente al de otro individuo también Klinefelter no mosaico, pero con una incidencia de disomías mucho menor (1,4%; Blanco et al. 2001).

VARONES CON ALTERACIONES DEL SEMINOGRAMA Y CARIOTIPO NORMAL

Numerosos autores han demostrado alteraciones del seminograma asociadas con incrementos de anomalías cromosómicas en espermatozoides de individuos de cariotipo somático normal

(Burrello et al., 2005; Machev et al., 2005; Miharu, 2005; Rives, 2005; Sarrate et al., 2005).

Hoy en día se está intentando acotar en que grupo de pacientes con alteraciones del seminograma los estudios de FISH en espermatozoides estarían especialmente indicados. No obstante, la variabilidad descrita entre los estudios publicados (número de individuos analizados, criterios de clasificación, características del grupo control, criterios de análisis, análisis estadístico) limita el establecimiento de indicaciones clara. Esta situación ha conducido a que algunos autores se cuestionen la técnica como herramienta de diagnóstico clínico (Foresta et al., 2002).

Otro aspecto de los estudios de FISH en espermatozoides que suscita interés en el ámbito del diagnóstico clínico es la determinación del número y del tipo de cromosomas que deben de ser analizados. La mayoría de los centros que han incorporado la técnica basan sus resultados en el análisis de las anomalías numéricas, en concreto disomías y diploidías, para cinco cromosomas: X, Y, 13, 18 y 21. Recientemente, un número considerable de centros han comenzado a incluir otros cromosomas en sus estudios, con la idea de que cuanto más información más precisión en el diagnóstico. Esta situación ha planteado dudas acerca de cómo elegir la estrategia más coherente y equilibrada en relación al tiempo de análisis, coste y resultados obtenidos.

Finalmente es importante destacar que la mayoría de los incrementos descritos en la frecuencia de anomalías espermáticas son incrementos moderados, derivando en interpretaciones diferentes a partir de un mismo resultado y, por tanto, en un consejo genético reproductivo diferente.

Partiendo de la situación descrita previamente, y a partir de la recopilación de los resultados de FISH en espermatozoides realizados en nuestro laboratorio entre 1998 y 2005 nos planteamos un estudio retrospectivo con tres objetivos básicos (Sarrate et al, aceptado para publicación):

1. Acotar las indicaciones.

2. Determinar el número básico de cromosomas a estudiar y precisar cuales son al fin de optimizar la técnica en términos de tiempo, coste e información.

3. Establecer directrices para la interpretación de los resultados.

Analizamos un total de 319 muestras de semen de individuos infértiles de etiología desconocida. El historial de los pacientes incluía la edad, los datos del seminograma, el cariotipo (266/319) y en algunos casos el resultado del estudio meiótico (106/319).

A partir del análisis de cinco cromosomas del complemento (X, Y, 13, 18 y 21), los resultados poblacionales pusieron de manifiesto la elevada incidencia de individuos con incrementos significativos respecto de la población, un 14,73% (47/319). Las disomías de los cromosomas sexuales y las del cromosoma 21 eran los genotipos responsables de estos incrementos ($p < 0.05$). Cuando los individuos se agruparon según la clasificación seminológica (Tabla I), los porcentajes

oligoastenozoospermicos (28.3%) y oligoastenoteratozoospermicos (17%).

De hecho, la disminución en el recuento espermático fue el único parámetro del seminograma que mostró correlación con el incremento de anomalías cromosómicas en gametos (Figura 1).

Con respecto a la relación entre los resultados de FISH en espermatozoides y el estudio meiótico (Tabla II), un 27% de los individuos con un cariotipo meiótico alterado mostraban incrementos significativos de anomalías cromosómicas en gametos. Este porcentaje fue del 8% para los casos de meiosis normal y FISH alterada.

Estos resultados ponen de manifiesto la ausencia de efectos de algunas de las anomalías meióticas detectadas en la carga genética final de los espermatozoides, un resultado coincidente con la falta de efectos de las anomalías sinápticas de los autosomas en metafase I en el genotipo de las células en el estadio de metafase II (Sarrate et al. 2007). La ausencia de efectos se ha relacionado con la

Tabla I: Número y porcentaje de individuos con un resultado de FISH en espermatozoides alterado para cada una de las variantes del seminograma.

Seminograma	Individuos con anomalías	%
Astenozoospermia	4/51	7.8
Astenoteratozoospermia	4/57	7.0
Normozoospermia	4/24	16.7
Oligozoospermia	1/3	33.3
Oligoastenozoospermia	13/46	28.3
Oligoteratozoospermia	1/10	10
Oligoastenoteratozoospermia	9/53	17
Tetrazoospermia	1/3	7.7

Tabla II: Relación entre los resultados de FISH en espermatozoides y el estudio meiótico clásico. Cada celda indica a los individuos con coincidencia de resultados (número y porcentaje).

	FISH normal	FISH alterada
Meiosis normal	92% (33/36)	8% (3/36)
Meiosis alterada	73% (51/70)	27% (19/70)

más elevados de individuos con anomalías se observaron en los grupos que presentaban un bajo recuento espermático: oligozoospermicos (33.3%),

eliminación selectiva de las células portadoras de anomalías (Blanco et al. 2001, 2003). Una interpretación alternativa es considerar el resultado de

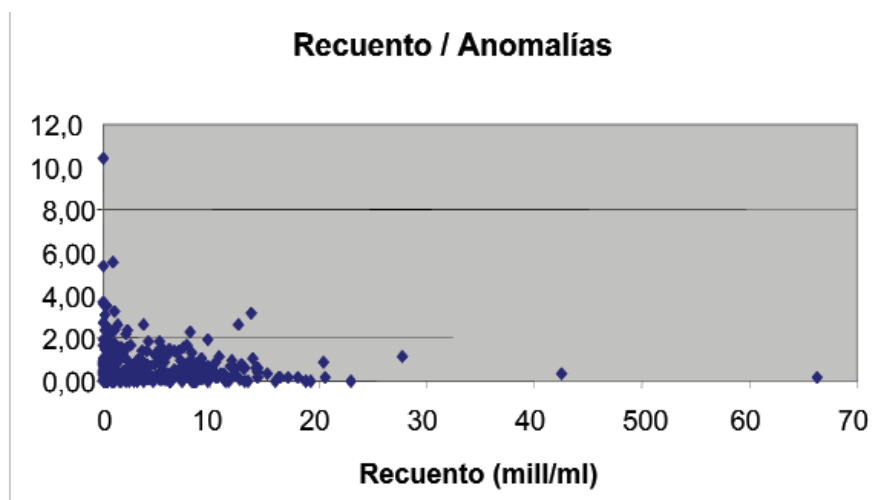


Figura 1: Correlación inversa ($p < 0.05$) entre la disminución del recuento espermático y el incremento de anomalías cromosómicas.

la FISH en espermatozoide como falsos negativos, dado que no se analizan todos los cromosomas del cariotipo. En este sentido, es importante remarcar que ninguno de los 319 individuos analizados mostró incrementos significativos de disomías para los cromosomas 13 o 18. Además, en la literatura especializada ningún individuo ha mostrado incrementos exclusivos de los autosomas (exceptuando el 21), sin que vayan acompañados de incrementos de disomías para los cromosomas sexuales o de espermatozoides diploides (Sarrate et al. Aceptado para publicación). A nuestro entender, estas observaciones cuestionan el argumento de los falsos negativos de la FISH en espermatozoides, al tiempo que indican que la técnica, mediante el análisis de tres cromosomas (X, Y, 21), puede clasificar a los pacientes en función del riesgo de transmisión de una anomalía cromosómica a la descendencia.

En términos generales, los incrementos de anomalías cromosómicas observados en los pacientes de nuestra serie (desde un mínimo de 0,54% hasta un máximo de 4,92%) y los publicados en la literatura especializada, muestran valores moderados (Sarrate et al. 2005). Un resultado de FISH alterado es la manifestación citológica de anomalías en los procesos de apareamiento, recombinación y/o segregación cromosómica. La presencia de frecuencias incrementadas de anomalías cromosómicas en espermatozoides se ha relacionado con disminuciones de la tasa de embarazo (Rubio et al. 2001), con

incremento de abortos (Rubio et al. 1999, 2001; Carrell et al. 2003) y con un incremento de embriones cromosómicamente desequilibrados (Gianaroli et al. 2005). En consecuencia, un resultado alterado se tiene que interpretar como una indicación para la aplicación de técnicas de diagnóstico citogenético en etapas embrionarias (diagnóstico genético preimplantacional) o fetales (diagnóstico genético prenatal).

En resumen, el estudio de FISH en espermatozoides en individuos con problemas de fertilidad se aconseja claramente en pacientes de cariotipo somático normal que presentan un recuento espermático bajo. En individuos con otras alteraciones del seminograma, su aplicación dependerá de la historia reproductiva de la pareja. La máxima competitividad de la técnica en términos de tiempo, gasto económico y utilidad diagnóstica se consigue analizando tres cromosomas X, Y y 21. Finalmente, un resultado alterado tiene que formar parte del conjunto de indicaciones de los diagnóstico genético preimplantacional y prenatal.

BIBLIOGRAFÍA

Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F (2004) Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation $t(13;14)(q10;q10)$ Hum Reprod 19:1345-1351.

Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F (2005) Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review. Cytogenet Gen Res 111:297-304.

Anton E, Sarrate Z, Blanco J, Egozcue J, Vidal F (2006) Role of sperm FISH studies in the reproductive advice of carriers of structural chromosome anomalies. Hum Reprod 21:60-62

Blanco J, Egozcue J, Vidal F (2001) Meiotic behaviour of the sex chromosomes in three patients with sex chromosome anomalies (47,XXY, mosaic 46,XY/47,XXY and 47,XYY) assessed by fluorescence in situ hybridization. Hum Reprod 16:887-892.

Blanco J, Farreras A, Egozcue J, Vidal F (2003) Meiotic behaviour of the sex chromosomes in a 45,X/46,X,r(Y),dic r(Y) patient assessed by FISH. Fertil Steril 79:913-918.

Burrello N, Vicari E, Calogero AE (2005) Chromosome abnormalities in spermatozoa of patients with azoospermia and normal somatic karyotype. Cytogenet Genome Res 111:363-365.

Carrell DT, Wilcox AL, Lowy L, Peterson CM, Jones KP, Erickson L, Campbell B, Branch W, Hatasaka HH (2003) Elevated Sperm Chromosome Aneuploidy and apoptosis in Patients With Unexplained Recurrent pregnancy Loss. Am Col Obstet Gynecol 101:1229-1235.

De Braekeleer M, Dao TN (1991) Cytogenetic studies in male infertility: a review. Hum Reprod 6: 245-250.

Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, García F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F, Egozcue J (2000) Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. Hum Reprod Update 6:93-105.

Estop AM, Munne S, Cieply KM, Vandermark KK, Lamb AN, Fisch H (1998) Meiotic products of a Klinefelter 47,XXY male as determined by sperm fluorescence in situ hybridization analysis. Hum Reprod 13:124-127.

Foresta C, Ferlin A, Gianaroli L, Dallapiccola B (2002) Guidelines for the appropriate use of genetic tests in infertile couples. Eur J Hum Genet 10:303-312.

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP (2005) Sperm and Blastomere Aneuploidy Detection in Reproductive Genetics and Medicine. J Histochem Cytochem 53:261-267.

Griffin DK, Huland P, Tempest HG, Homa ST (2003) Should men undergoing ICSI be screened for chromosome abnormalities in their sperm. *Hum Reprod* 18:229-235.

LEY 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida. *Boletín Oficial del Estado* 126:19947-19956.

Machev N, Gosset P, Viville S (2005) Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: teratozoospermia. *Cytogenet Genome Res* 111:352-357.

Maduro MR, Lo kc, Chuang WW, Lamb DJ (2003) Genes and male infertility. What can go wrong?. *J Androl* 24:285-493.

Miharu N (2005) Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: oligozoospermia.

Cytogenet Genome Res 111:347-351. Mroz K, Hassold TJ, Hunt PA (1998) Meiotic aneuploidy in the XXY mouse: evidence that a compromised testicular environment increases the incidence of meiotic errors. *Hum Reprod* 14:1151-1156.

Rives NM (2005) Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: asthenozoospermia. *Cytogenet Genome Res* 111:358-362.

Rubio C, Simón C, Blanco J, Vidal F, Mínguez Y, Egozcue J, Crespo J, Remohí J, Pellicer A (1999) Implication of sperm chromosome abnormalities in recurrent miscarriage. *J Assist Reprod Genet* 16:253-258.

Rubio C, Gil-Salom M, Simón C, Vidal F, Rodrigo L, Mínguez Y, Remohí J, Pellicer A (2001) Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population:

relationship with sperm quality and ICSI outcome *Hum Reprod* 2001 16:2084-2092.

Sarrate Z, Blanco J, Anton E, Egozcue S, Egozcue J, Vidal F (2005) Estudio de anomalías cromosómicas en células germinales masculinas mediante FISH. *Cuadernos de Medicina Reproductiva* 11:61-73.

Sarrate Z, Blanco J, Vidal F (2007) Random reduction in the frequency of chiasmata in OAT patients analysed by M-FISH. *Chrom Res* 15 (Suppl 2):89.

Sarrate Z, Vidal F, Blanco J. Role of sperm fluorescent in situ hybridization studies in infertile patients: indications, study approach, and clinical relevance. *Fertil Steril* (aceptado para publicación; doi:10.1016/j.fertnstert.2008.12.139)

INFERTILIDAD Y GENÉTICA: PRODUCCIÓN DE GAMETOS A PARTIR DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS.

Ana Isabel Marqués Marí, Carlos Simón

Banco Nacional de Células Madre, Nodo Valencia. Centro de Investigación Príncipe Felipe. Valencia.

E-mail: amarques@cipf.es

INTRODUCCIÓN

Las células madre son células indiferenciadas que retienen la capacidad de proliferación y diferenciación a células especializadas bajo condiciones controladas, tanto durante el desarrollo embrionario como para reemplazar las células perdidas como consecuencia de la renovación normal, o por enfermedad, en los tejidos específicos en los que pueden encontrarse.

Dependiendo de su procedencia se distinguen, clásicamente, tres tipos diferentes de células madre: embrionarias, germinales y adultas. Recientemente se ha añadido un cuarto tipo celular, las células iPS (del inglés induced pluripotent stem cells), obtenidas tras reprogramación de células adultas diferenciadas y con características muy similares a las células madre embrionarias.

Las células madre embrionarias presentan dos cualidades principales: la capacidad de dividirse casi indefinidamente en cultivo permaneciendo indiferenciadas, y la de diferenciarse en cualquier tipo celular perteneciente a cada una de las tres capas germinales embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo.

Desde 2000, año en que Reubinoff y colaboradores (Reubinoff et al., 2000) demostraran el potencial de estas células para ser diferenciadas in vitro, ha habido muchos progresos en este campo, y se han publicado numerosos trabajos con distintos métodos y aproximaciones para la diferenciación de células madre embrionarias hacia distintos tipos celulares, incluyendo células germinales.

Esta capacidad de las células madre embrionarias para diferenciarse en células germinales y gametos ha causado un gran impacto debido a su potencial aplicación en la medicina

reproductiva. La generación de estos gametos in vitro podría ayudar a parejas infértiles con problemas en producción o fertilización de ovocitos y/o espermatozoides, respondiendo a la creciente demanda de descendencia propia por parte de estas parejas.

Los resultados obtenidos en animales han creado expectativas hasta ahora inéditas. En los últimos años, varios grupos han demostrado que las células madre embrionarias de ratón pueden diferenciarse en espermatozoides (Toyooka et al., 2003; Geijsen et al., 2004; Nayernia et al., 2006) y ovocitos (Hübner et al., 2003; Lacham-Kaplan et al., 2006; Novak et al., 2006; Qing et al., 2007), incluso que las células madre embrionarias humanas pueden también diferenciarse a células germinales en cultivo bajo condiciones adecuadas (Clark et al., 2004; Kee et al., 2006; Chen et al., 2007; Nayernia et al., 2009; Park et al., 2009. Para una revisión Marqués-Marí et al., 2009).

En cualquier caso, aunque esta diferenciación ha sido ya inducida en el laboratorio, falta todavía mucha información acerca de los factores microambientales y factores clave que regulan los procesos de diferenciación de las células madre y de formación de gametos.

Así, aunque ocasionalmente pueden ser generados gametos con las condiciones de cultivo apropiadas, su capacidad para generar un ser vivo sano es, de momento, muy cuestionable y requiere ulteriores investigaciones. Cabe mencionar, al respecto, el trabajo realizado por el grupo de Nayernia y colaboradores en 2006

(Nayernia et al., 2006). Si bien los autores obtuvieron gametos masculinos capaces de generar descendencia viable a partir de células madre embrionarias de ratón, lo cierto es que los animales murieron prematuramente.

MÉTODOS

En los últimos años la investigación en gametos derivados a partir de células madre ha cobrado importancia y se ha ganado la atención del campo de la biología reproductiva.

En el presente capítulo se pretende poner de manifiesto el progreso en la

investigación en los últimos años en generación de gametos a partir de células madre embrionarias (Tabla I), tanto en ratón como en humanos, y los potenciales beneficios que puede tener para terapias de reproducción.

Sin duda, cuanto más detallada sea la información de la que se disponga acerca del proceso de gametogénesis in vivo, se podrán plantear las estrategias más adecuadas para poder obtener los gametos in vitro (Figura 1).

Una de las principales dificultades en la diferenciación de células germinales in vitro es la falta de métodos no invasivos que permitan la visualización de las células germinales durante su desarrollo y distinguir las de las células somáticas. Una estrategia para resolver este problema es mediante la transfección de las líneas de células madre embrionarias con proteínas marcadas o fluorescentes asociadas a los promotores de determinados genes (genes implicados en pluripotencia o en desarrollo de la línea germinal). Esto posibilita la visualización de las células en las cuales se está expresando el gen de interés durante el proceso de diferenciación. Sin embargo, el uso de líneas transfectadas hace imposible el uso de los gametos obtenidos para su aplicación en terapia clínica.

Básicamente, se han usado dos métodos para diferenciación de células germinales a partir de células madre embrionarias, tanto en ratón como en humano. El primero de ellos consiste en la diferenciación espontánea en cultivo adherente o monocapa (Hübner et al., 2003; Novak et al., 2006; Nayernia et al., 2006b; Chen et al., 2007; Park et al., 2009; Nayernia et al., 2009), mientras que el segundo implica la formación de estructuras tridimensionales llamadas cuerpos embrionarios (Toyooka et al., 2003; Geijsen et al., 2004; Clark et al., 2004; Lacham-Kaplan et al., 2006; Qing et al., 2007; Chen et al., 2007). Combinando además, cualquiera de estos dos métodos con la adición de factores exógenos al medio de cultivo.

RESULTADOS

Células germinales a partir de células madre embrionarias de ratón.

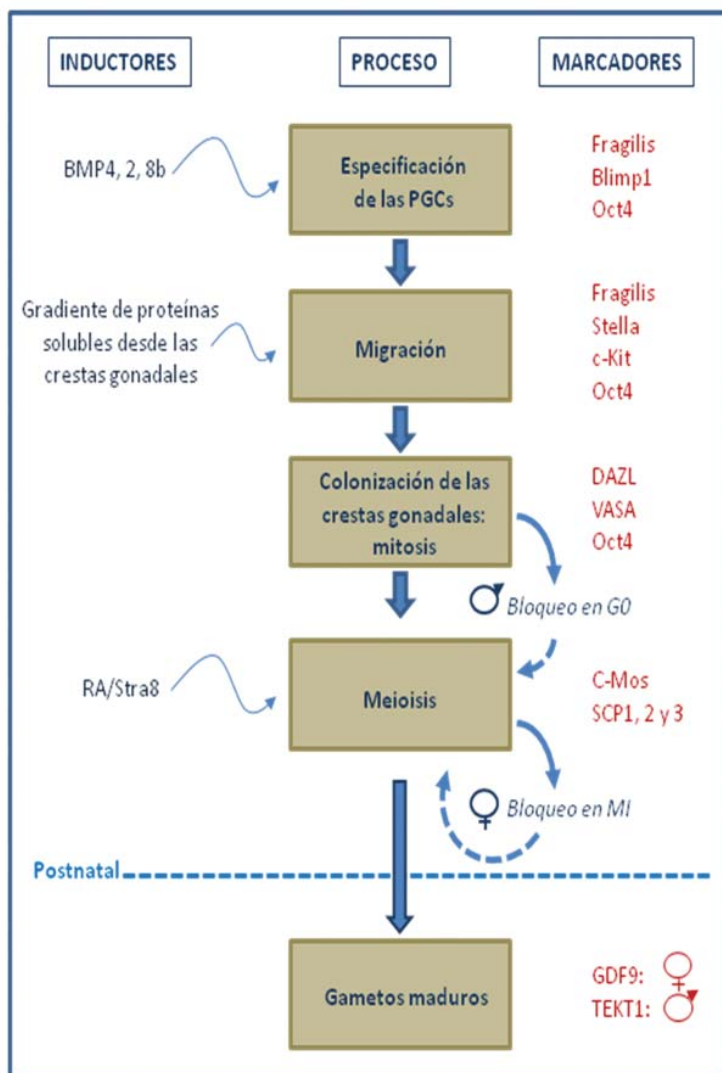


Figura 1.- Durante el desarrollo embrionario in vivo, el establecimiento de la línea germinal engloba distintas etapas identificadas por diferentes marcadores moleculares, inducidas y guiadas por distintos factores. En humanos, las PGCs se originan a partir de una población celular localizada en el epiblasto, por efecto de BMP4, 2 y 8b procedentes del ectodermo extra-embrionario. Estas células empiezan a migrar hacia las crestas gonadales y allí empiezan a proliferar por mitosis. En este punto, las células germinales masculinas y femeninas presentan, condicionados por sus respectivos nichos, comportamientos distintos: las células germinales masculinas se bloquean durante el proceso de mitosis, mientras que las femeninas entran en meiosis y se bloquean en MI. Durante la vida postnatal ambas poblaciones finalizan el proceso de meiosis y sufren un proceso de maduración, dando lugar a gametos maduros. Las líneas discontinuas indican proceso postnatal.

Usando este primer método, basado en retirar los factores que promueven pluripotencia, como feeders y bFGF o LIF (en el caso de células embrionarias de ratón), Hübner y colaboradores publicaron la obtención de estructuras similares a folículos ováricos *in vitro* en 2003. Tras estimulación con gonadotropinas, estos folículos extruían una célula central, supuestamente un ovocito con una zona pelúcida muy frágil

Poco tiempo después, Toyooka et al. (2003) y Geijsen et al. (2004), consiguieron diferenciar células germinales masculinas a partir de células madre embrionarias de ratón, combinando la formación de cuerpos embrioides tridimensionales con el uso de líneas celulares marcadas en genes asociados a pluripotencia o específicos de línea germinal, y la adición de factores de crecimiento al medio de cultivo.

Geijsen y colaboradores transfectaron una línea celular en la que marcaron el locus para el gen Oct4 (marcador de pluripotencia, también expresado en PGCs, células germinales primordiales). Diferenciaron las células mediante la formación de cuerpos embrioides y añadieron ácido retinoico (AR) al medio de cultivo para expandir la población de PGCs. Mediante análisis por PCR se detectó la expresión de marcadores específicos de línea germinal masculina, pero también de células de Leydig y de Sertoli. Así, aunque se encontraron algunas células haploides, los resultados sugieren una ineficiente meiosis en el microambiente de los cuerpos embrioides. Para testar la funcionalidad de estas células haploides derivadas de los cuerpos embrioides los autores fertilizaron ovocitos normales. Alrededor de un 20% de estos progresaron hasta blastocisto, pero no se analizó si los embriones eran capaces de desarrollarse normalmente tras transferencia uterina.

Los mejores resultados en cuanto a progresión del proceso de meiosis y formación de gametos haploides se obtuvieron tras trasplantar las células germinales obtenidas *in vitro* en los testículos de ratones químicamente esterilizados para su desarrollo y maduración final hasta gametos (Nayernia et al., 2006). Los autores obtuvieron descendencia viable tras la fertilización de ovocitos normales con los gametos obtenidos mediante diferenciación de las ESCs (del inglés *embryonic stem cells*, células madre embrionarias).

El diseño experimental incluía la transfección de las ESCs de ratón con genes modificados ligados a la vía espermatogonial, para, de este modo, posibilitar la detección y aislamiento de las células en las que estos genes estuvieran activados. La diferenciación se indujo mediante la formación de cuerpos embrioides e incluía la adición de AR al medio de cultivo. Detectaron células fluorescentes con motilidad que eran liberadas al medio. Estas células fueron analizadas y se observó la expresión de marcadores meióticos y postmeióticos tras la adición de AR. Para determinar su funcionalidad *in vivo* las células fueron trasplantadas en

DIFERENCIACION DE CÉLULAS GERMINALES A PARTIR DE ESCs			
Autores y fecha de publicación	Origen de SC	Tipo celular obtenido	Descendencia Viable
Hübner et al. 2003	mESCs – XX,XY	Ovocitos	No, BP
Toyooka et al. 2003	mESCs - XY	PGCs <i>in vitro</i> , esperma <i>in vivo</i> tras trasplante	NT
Geijsen et al. 2004	mESCs - XY	Espermátidas	No, FO
Clark et al. 2004	hESCs – XX, XY	Ovocitos (aunque había expresión de TEKT1)	NT
Lacham-Kaplan et al. 2006	mESCs - XY	Ovocitos inmaduros	NT
Novak et al. 2006	mESCs - XY	Folículos ováricos	NT
Nayernia et al. 2006	mESCs - XY	Espermatozoides	Yes
Kee et al. 2006	hESCs - XX	Células tipo ovocito	NT
Chen et al. 2007	hESCs - XX	Células tipo ovocito	No, DF
Qing et al. 2007	mESCs - XY	Ovocitos	NT
Park et al. 2009	hESCs - XX, XY hiPS - XY	PGCs	NT
Nayernia et al. 2009	hESC - XY	Espermatozoides	NT

Tabla I.- Resumen de los trabajos más destacados en la diferenciación de células de la línea germinal a partir de células madre embrionarias. ESC: (del inglés *embryonic stem cells*) células madre embrionarias; NT: no testado; BP: blastocisto partenogenético; FO: fertilización de ovocitos; DF: degeneración de folículos; hESCs: células madre embrionarias humanas; mESCs: células madre embrionarias de ratón; PGCs: (del inglés *primordial germ cells*) células germinales primordiales.

debido a la ausencia de la proteína ZP1. La presencia de proteínas específicas de meiosis como SCP3 indicaba la entrada de los ovocitos en meiosis.

Sin embargo, cuando Novak y colaboradores (2006) replicaron los experimentos vieron que no se expresaban otras proteínas de meiosis como SCP1 y SCP2 o Rec8. Así, aunque en algunas de estas células se ha iniciado el proceso de meiosis, el programa no progresa de forma adecuada, al menos *in vitro*. Algunas de estas estructuras, además, se activaron espontáneamente llevando a la formación de embiones partenogenéticos, los cuales se bloquearon y degeneraron en estadios tempranos de desarrollo.

Toyooka y colaboradores marcaron el locus para el gen Mvh (homólogo de Vasa en ratón, marcador premeiótico específico de línea germinal) para detectar la diferenciación de células madre embrionarias a células de la línea germinal *in vitro*. Tras cultivo, las células marcadas fluorescentes, las cuales estaban expresando el gen Mvh, fueron aisladas y cultivadas con gónadas masculinas de estadio embrionario E13.5. Estos agregados se trasplantaron en los testículos de ratones para testar el potencial de las células diferenciadas, y, tras dos meses, espermatozoides marcados fluorescentes fueron detectados en los túbulos seminíferos de estos animales. No obstante, no se hizo ningún análisis posterior para determinar la funcionalidad del esperma obtenido.

testículos de ratones estériles y se obtuvieron espermatozoides haploides, aunque sin motilidad, con los cuales se fertilizaron ovocitos normales. Como resultado nacieron doce animales que, sin embargo, murieron prematuramente, probablemente debido a un patrón epigenético anormal en los gametos obtenidos in vitro.

Dos estudios han explorado sistemas de co-cultivo para diferenciar ovocitos a partir de ESCs de ratón (Lacham-Kaplan et al., 2006; Qing et al., 2007), ambos mediante la formación de cuerpos embrioides.

proteína esencial para la sinapsis de cromosomas homólogos durante el proceso de meiosis su localización es nuclear).

En ambos estudios, los ovocitos obtenidos carecían de zona pelúcida y su apariencia era muy similar a la de gonocitos en una fase temprana del proceso de ovogénesis in vivo. Estos ovocitos, curiosamente, no sufrieron activación espontánea para dar blastocistos partenogénéticos como los descritos por Hübner et al. (2003).

expresión de genes durante distintos estadios del proceso de diferenciación de las ESC humanas a células germinales in vitro: migración, colonización, mitosis, meiosis, etc., facilitando de este modo la caracterización de las células de la línea germinal y permitiendo su localización y aislamiento durante el proceso de diferenciación. Además, observaron que las hESCs indiferenciadas también expresan algunos marcadores tempranos de la línea germinal como DAZL, Stellar o c-Kit, pero no otros como VASA, SCP3 o GDF9, que son específicos de células germinales (Figura 2).

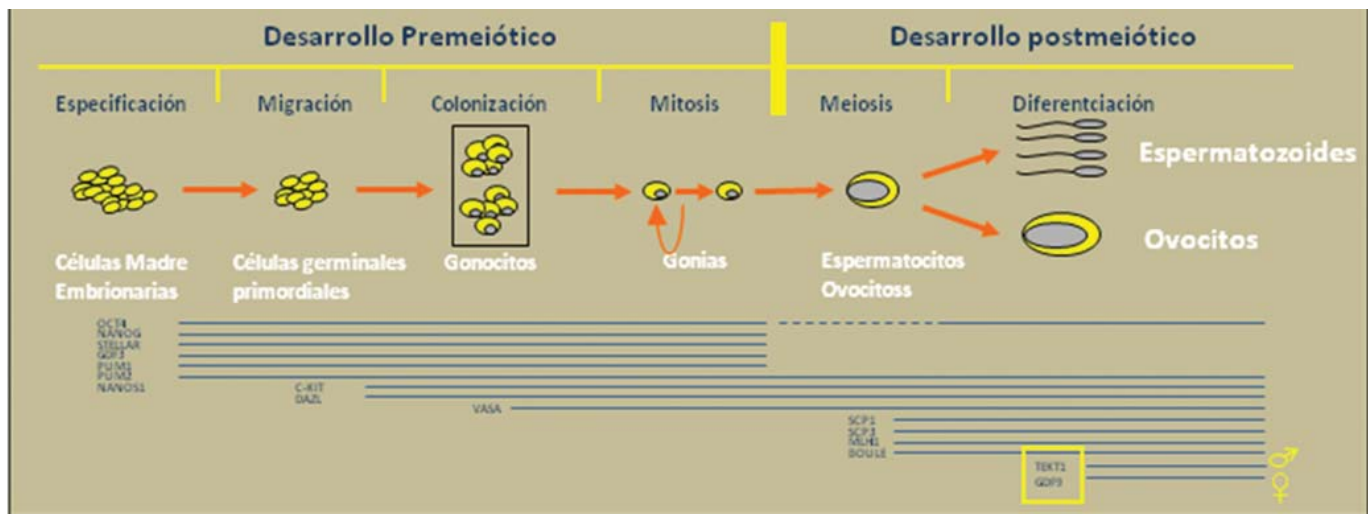


Figura 2.- Las distintas etapas en el desarrollo de la línea germinal in vitro se corresponden con la expresión de determinados marcadores moleculares. Dado que las células madre embrionarias indiferenciadas comparten la expresión de algunos marcadores con células de la línea germinal durante estadios tempranos de desarrollo tales como DAZL, Stellar, c-Kit, Oct4 o Nanog, para la detección de estas células se consideran más útiles marcadores meióticos y postmeióticos, específicos de células germinales, siendo VASA uno de los más utilizados.

Lacham-Kaplan y colaboradores (2006) exploraron los efectos del medio condicionado obtenido de cultivos celulares de células testiculares en la diferenciación de ESCs de ratón a células germinales mediante formación de cuerpos embrioides. Los autores demostraron que tras cultivar los cuerpos embrioides con el medio condicionado obtenían un mayor número de estructuras similares a ovocitos incluidas en lo que parecían folículos ováricos.

Qing y colaboradores (2007), de modo similar, generaron cuerpos embrioides a partir de las ESCs y los transfirieron sobre una monocapa de células de granulosa de ratón. Tras 10 días en cultivo identificaron células similares a ovocitos dentro de dichos cuerpos embrioides. Sin embargo, aunque detectaron la expresión del marcador específico de meiosis SCP3, estaba localizado en el citoplasma (como

Células germinales a partir de células madre embrionarias humanas.

Los trabajos realizados en la diferenciación de células germinales a partir de ESC en humanos han dado similares resultados a los descritos en ratón. Las células diferenciadas in vitro a partir de células madre embrionarias, ya sea mediante la formación de cuerpos embrioides o en monocapa, expresan marcadores de células germinales humanas (Clark et al., 2004; Kee et al., 2006; Chen et al., 2007; Nayernia et al., 2009; Park et al., 2009).

Clark y colaboradores (Clark et al., 2004) obtuvieron células de la línea germinal mediante la formación de cuerpos embrioides a partir de ESC indiferenciadas, las cuales fueron analizadas mediante PCR. Con este modelo establecieron una secuencia de

En un trabajo posterior, el mismo grupo demostró que la combinación de factores exógenos tales como BMP-4, BMP-7 y BMP-8 añadidos al medio de cultivo incrementa el porcentaje de células VASA positivas, y, por tanto, el número de posibles células germinales, pero no necesariamente induce el progreso correcto del proceso de meiosis (Kee et al., 2006).

No obstante, de los pocos estudios que exploran la habilidad de las ESCs humanas para diferenciarse en células germinales, el estudio publicado por Chen y colaboradores (2007) es el único que describe estructuras foliculares obtenidas tras la diferenciación en cultivo, ya sea en monocapa o mediante la formación de cuerpos embrioides. Sin embargo, a pesar de la detección por PCR del marcador GDF9 (marcador postmeiótico específico de ovocitos), los

autores no caracterizaron las células incluidas dentro de las estructuras foliculares para identificarlas como ovocitos.

Muy recientemente, dos nuevos trabajos han sido publicados demostrando la diferenciación de células germinales a partir de hESCs.

Park y colaboradores (Park et al., 2009) reportaron la obtención de PGCs mediante el co-cultivo de hESCs indiferenciadas con células gonadales fetales humanas. La detección de co-localización de los marcadores c-Kit y SSEA1 mediante citometría de flujo, los cuales también co-localizan con VASA, fue usada como un indicador de la diferenciación a la línea germinal. Del mismo modo, también obtuvieron PGCs desde células iPS, aunque con una menor eficiencia. Tras analizar el estado de imprinting de las células obtenidas vieron que estas habían iniciado el proceso de borrado característico de las células germinales durante el primer trimestre de desarrollo embrionario in vivo.

Nayernia y colaboradores (Nayernia et al., 2009) obtuvieron GSC (del inglés germ stem cells, células madre germinales) masculinas desde hESCs transfectadas con un constructo ligado a la vía espermatogonial. La diferenciación se indujo en monocapa tras la retirada de bFGF y posteriormente se añadió AR al medio de cultivo. Las células marcadas se aislaron mediante citometría de flujo y se cultivaron posteriormente con la adición de diversos factores exógenos al medio de cultivo. Las células obtenidas expresaban marcadores meióticos y postmeióticos, indicando la maduración a gametos masculinos haploides.

Así pues, estas células eran capaces de entrar en el proceso de meiosis, generando células haploides y con motilidad in vitro, muy similares a espermatozoides.

Dado que son células humanas, y debido a la legalidad vigente, no han podido probar la funcionalidad de estos gametos in vivo, ya que esto implicaría o bien la formación de quimeras humano-animal o la generación de embriones humanos en laboratorio.

CONCLUSIONES

Así pues, aunque se han conseguido grandes avances en los últimos años en la diferenciación in vitro de células germinales a partir de células madre embrionarias, aún sigue siendo necesario proseguir con las investigaciones al respecto para entender y desarrollar los nichos apropiados y las condiciones de cultivo idóneas. El proceso de diferenciación de gametos in vitro, debería ser, además, fiable y reproducible si se quiere trasladar su empleo a terapia clínica.

Una de las mayores dificultades durante el proceso de diferenciación es la detección y selección de las células germinales obtenidas. Dado que las ESC comparten algunos marcadores con las PGCs, las alternativas son la detección de marcadores meióticos y postmeióticos o la transfección de las líneas de ESC con marcadores fluorescentes ligados a promotores específicos de células germinales. Sin embargo, los métodos que implican modificaciones genéticas y el uso de vectores retrovirales impiden que los gametos obtenidos puedan ser usados en un futuro en clínica.

Si bien, los principales problemas en los que deben incidir las futuras investigaciones en la diferenciación de gametos a partir de ESC es la consecución del proceso de meiosis correctamente para evitar aneuploidías, y el establecimiento de un patrón epigenético adecuado. De este modo, los gametos derivados de ESC podrían tener aplicación clínica en técnicas de reproducción asistida en aquellos casos en que los pacientes carecen de gametos o estos no son funcionales.

BIBLIOGRAFÍA

Chen, H.F., Kuo, H.C., Chien, C.L. et al (2007) Derivation, characterization and differentiation of human embryonic stem cells: comparing serum-containing versus serum-free media and evidence of germ cell differentiation. *Hum.Reprod.*, 22, 567-577.

Clark, A.T., Bodnar, M.S., Fox, M. et al (2004) Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro. *Hum.Mol.Genet.*, 13, 727-739.

Geijsen, N., Horoschak, M., Kim, K. et al (2004) Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature*, 427, 148-154.

Hubner, K., Fuhrmann, G., Christenson, L.K. et al (2003) Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science*, 300, 1251-1256.

Kee, K., Gonsalves, J.M., Clark, A.T. et al (2006) Bone morphogenetic proteins induce germ cell differentiation from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.*, 15, 831-837.

Lacham-Kaplan, O., Chy, H., and Trounson, A. (2006) Testicular cell conditioned medium supports differentiation of embryonic stem cells into ovarian structures containing oocytes. *Stem Cells*, 24, 266-273.

Nayernia, K., Nolte, J., Michelmann, H.W. et al (2006) In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev.Cell*, 11, 125-132.

Nayernia, K., Lee, J.H., Lako, M. et al (2009) In Vitro Derivation of Human Sperm from Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev.* doi:10.1089/scd.2009.0063.

Novak, I., Lightfoot, D.A., Wang, H. et al (2006) Mouse embryonic stem cells form follicle-like ovarian structures but do not progress through meiosis. *Stem Cells*, 24, 1931-1936.

Park, T.S., Galic, Z., Conway, A.E. et al (2009) Derivation of primordial germ cells from human embryonic and induced pluripotent stem cells is significantly improved by coculture with human fetal gonadal cells. *Stem Cells*, 27, 783-795.

Qing, T., Shi, Y., Qin, H. et al (2007) Induction of oocyte-like cells from mouse embryonic stem cells by co-culture with ovarian granulosa cells. *Differentiation*, 75, 902-911.

Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y. et al (2000) Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat.Biotechnol.*, 18, 399-404

Toyooka, Y., Tsunekawa, N., Akasu, R. et al (2003) Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 100, 11457-11462.



Somos los primeros
en conocerte ...

... y sabemos que
crecerás sano

www.pgdcem.com

SERVICIOS

Servicio de diagnóstico genético preimplantacional: ovocitos y embriones

Estudio de aneuploidías

Estudio de reorganizaciones cromosómicas

Estudio de enfermedades monogénicas

- >200 enfermedades hereditarias
- Tipaje HLA
- Tramitación de expedientes para CNRHA
- Consejo genético en el centro FIV

Estudio genético del factor masculino

FISH en espermatozoides

Test de Fragmentación del DNA en espermatozoides

Microdeleciones del cromosoma Y

Test CVBA (screening de 30 mutaciones del gen
CFTR+polimorfismo IVS8-Tn)

Otros servicios

Biopsia y procesado de blastómeros y corpúsculo polar en su
propio centro

Formación de embriólogos en técnicas de micromanipulación

>100 biólogos nacionales e
internacionales ya se han
formado con nosotros

Consulta nuestros cursos prácticos
en técnicas de micromanipulación:

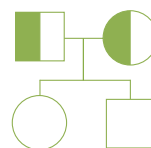
- Cursos anuales
- Cursos personalizados



centro de medicina
embrionaria

www.pgdcem.com

Madrid y Barcelona - España



Reproductive
Genetic
Institute

Chicago - USA

CME Madrid - Medea, 4 ·3ºD Edificio ECU. 28037 Madrid - Tf. 91 411 50 80 - Fax 91 411 50 81

CME Barcelona - Trias i Pujol, 5. 08034 Barcelona - Tf. y Fax 93 280 40 28

pgd@pgdcem.com

LA MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA: APLICACIONES CLÍNICAS EN LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Gemma Arroyo

Institut Universitari Dexeus, Barcelona

INTRODUCCIÓN

La calidad del ovocito y del embrión que se genera a través de él son aspectos determinantes del éxito en FIV. La correcta maduración del ovocito implica una maduración nuclear y citoplasmática

La evaluación de la calidad del ovocito basada en criterios morfológicos ha sido extensamente estudiada (Serhal et al., 1997; Plachot et al., 2002; Ebner et al., 2006; Ubaldi et al., 2008) con el fin de poder establecer criterios de calidad con valor pronóstico.

Se han intentado establecer criterios morfológicos relacionados con la calidad ovocitaria tales como el color, la granularidad, la presencia de vacuolas e las inclusiones citoplasmáticas (Bolton et al., 1989). Muchos de estos cambios morfológicos corresponden a orgánulos intracitoplasmáticos y por ello son signo del metabolismo del ovocito y su potencial de desarrollo. Hasta este momento sólo se disponía de estos marcadores para la valoración del ovocito.

En el momento de la ovulación, los ovocitos se encuentran detenidos en metafase II de la meiosis. En este momento, los cromosomas se hallan dispuestos en la placa metafásica sujetos por los microtúbulos que la componen. Durante la meiosis y la fecundación las fibras del huso son las responsables de la segregación del material nuclear y anomalías en su frágil estructura pueden dar lugar a infertilidad, abortos y enfermedades genéticas fruto de anomalías cromosómicas.

Cerca del 80% de las aneuploidías del embrión son de origen materno (Hassold and Hunt, 2001) y existen evidencias de que el estado del huso y su

funcionamiento se ven afectados con el incremento de la edad materna (Battaglia et al., 1996). Gran parte de errores en la segregación de los cromosomas en la ovogénesis tienen lugar en la meiosis I. Estudios en ratones y humanos demuestran que con la edad incrementa el riesgo de errores meióticos en la anafase II. La edad puede inducir una precoz separación de las cromátidas (Mailhes and Young, 1998), reducción de la expresión de los genes que controlan el huso (Steuerwald, et al., 2005) y su degeneración (Eichenlaub-Ritter et al., 1988).

Clásicamente, la estructura del huso se visualizaba con técnicas invasivas como la microscopía electrónica, o marcadores fluorescentes en la microscopía confocal, incompatibles con la práctica clínica.

Recientemente, la luz polarizada ha demostrado ser equivalente a la microscopía confocal (Shen et al., 2008). Por otra parte, la inocuidad de la microscopía de luz polarizada, basada en las propiedades de birrefringencia de las moléculas que forman el huso, la presentan como alternativa ideal aplicable a las técnicas de fecundación in Vitro.

MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA

La birrefringencia es una propiedad óptica que deriva de la ordenación molecular encontrada en macromoléculas que forman las membranas, los microtúbulos, los microfilamentos y otros componentes del citoesqueleto (Oldenbourg, 1999). La luz polarizada pone de manifiesto la birrefringencia de estas estructuras dinámicas. La medida de la birrefringencia es la retardancia de la luz al atravesar estas estructuras.

El paso de un único haz de luz polarizada sobre el cuerpo birrefringente, hace que éste salga proyectado en 2 haces de luz ortogonales. En el inicio de la utilización de la técnica, la birrefringencia se medía como el cambio relativo de fase (retardancia) entre estos 2 haces de luz polarizada acoplados a un microscopio óptico convencional. Con la ayuda de compensadores y diferentes estados rotativos de estas estructuras tridimensionales, se logró ajustar la medida de la retardancia al tamaño y complejidad de husos. El proceso era lento y por ello imposible de aplicar a material biológico humano. Las retardancias conseguidas se analizaban ajustando manualmente el analizador y el compensador, y el hecho de que la luz se proyectara desde un mismo plano limitaba mucho las conclusiones (Oldenbourg, 1999).

Fue difícil lograr el paso siguiente hacia un procesador de imágenes digital, microscopios invertidos, luz polarizada casi circular y algoritmos que combinaban medidas de retardancia y orientación de la birrefringencia (Oldenbourg, 1999).

Finalmente era necesario calcular la intensidad de la luz necesaria para cada especie, así como demostrar la inocuidad de la técnica en sí. Las mediciones debían tomarse en muy poco tiempo si no se quería comprometer la viabilidad de los ovocitos (Silva et al., 1999; Liu et al., 2000; Wang et al., 2001a).

HUSO MEIÓTICO

Hay que recordar que el huso es una estructura tremendamente dinámica que depende de las condiciones de temperatura y manipulación de los ovocitos.

Visualización

Los ovocitos madurados in vivo presentan el huso visible en un 80% de los casos (Shen et al., 2005; Wang et al., 2001b; Rienzi et al., 2003). Dejar los ovocitos a temperatura ambiente 10 minutos induce daños irreversibles en el huso (Wang et al., 2001a). Por debajo de los 33°C el huso empieza a desintegrarse, siendo irreversible su reestructuración si la temperatura llega a los 25°C (Pickering et al., 1990). También cabe la posibilidad de que la reestructuración del huso de produzca de manera anómala, con el consecuente mal posicionamiento de los cromosomas y un aumento de aneuploidías. Aunque ya está extendido el funcionamiento de microscopios con placa calefactora, un buen control de calidad del funcionamiento del laboratorio es pues, la visualización del huso.

Presencia y localización

La presencia del huso se ha relacionado con mayores tasas de fecundación en algunos estudios (Wang et al., 2001b; Cooke et al., 2003; Rienzi et al., 2003, 2005; Cohen et al., 2004; Madaschi et al., 2008; Rama Raju et al., 2007) excepto en uno (Moon et al., 2003).

La posición del huso respecto al CP también se ha relacionado con las tasas de fecundación. Rienzi et al., 2003 encuentra relación a partir del desplazamiento de más de 90°. Esto puede ser debido a la manipulación durante la denudación de las células del cúmulo. Sin embargo Fang et al., 2007 no halla peor tasa de fecundación respecto a un grupo control sin visualización de huso.

La relación de la presencia del huso con el desarrollo embrionario tiene aspectos controvertidos. Algunos estudios lo relacionan con una mayor competencia en día 3 (Wang et al., 2001b; Cooke et al., 2003; Moon et al., 2003; Madaschi et al., 2008) y en la formación de blastocistos (Wang et al., 2001b; Rama Raju et al., 2007) pero no es así en otros (Rienzi et al., 2003; Cohen et al., 2004). En cuanto a las tasas de embarazo e implantación también se contradicen los resultados positivos (Madaschi et al., 2008) frente los negativos (Chamayou et al., 2006).

Dinamismo

Estudios de videocinematografía revelan que el huso es una estructura dinámica y que en telofase I desaparece por 40-60 min. En el peor de los casos, en la mayoría de ovocitos que no lo presentan tardará 2 h en reestructurarse y la tasa de fecundación no varía (Montag et al., 2006). Sólo aquellos ovocitos que pasadas estas 2-3h de cultivo siguen sin mostrar el huso tienen peor tasa de fecundación (Montag et al., 2006).

Tanto como la presencia, es importante tener en cuenta la localización del huso. A pesar de observar el primer corpúsculo polar, puede que el huso del ovocito en anafase tardía o telofase I, esté formando un puente entre CP y citoplasma. En caso de proceder a la microinyección espermática (ICSI) cuando todavía persiste este puente entre CP y citoplasma, lo más frecuente es que el momento de la valoración de la fecundación se observen 3 pronúcleos (PN) (Montag, datos no publicados).

Maduración in vitro

Shen et al., 2007 realizó un estudio para observar la dinámica de maduración in Vitro (MIV) de los ovocitos. Estudiaron ovocitos en profase I (VG) que retomaron la meiosis tras 12 horas de cultivo. Los primeros husos birrefringentes de MI se detectaron a las 12h. En 24h el 16.1% de las VG tenían huso MI, 17.9% alcanzaron la telofase I, y 14.3% extrusieron el primer corpúsculo polar (CP). Aunque a las 30h la mayoría tenían CP, sólo se observó huso en 28.7%. A las 36h presentaban CP el 66.1%, pero sólo en un tercio se visualizaba el huso.

Fang et al., 2007 halló huso en el 77.1% de los ovocitos madurados in Vitro, con una tasa de fecundación mayor cuando éste estaba adyacente al CP. Resultados que fueron confirmados por otros grupos (Arroyo et al., 2007; Almeida et al., 2008) y relacionados con embriones de mejor calidad.

Queda pendiente establecer el timing de los ovocitos de ciclos de MIV. Esto permitirá reducir la frecuencia de aneuploidías y optimizar el momento de la ICSI o congelación.

Congelación

El estudio de la de/construcción de los microtúbulos del huso también ha servido para la optimización de protocolos de congelación de los ovocitos (Rienzi et al., 2004; Ciotti et al., 2009). Se ha intentado encontrar paralelismo de las imágenes de microscopía polarizada con la confocal, dando importancia ya no sólo a la presencia o no del huso, si no también a la estructura y longitud de éste y a la localización de los cromosomas en la placa metafásica (Bromfield et al., 2009).

Densidad

Se ha intentado cuantificar la robustez del huso midiendo la longitud y grosor de las fibras a lo largo de los 0.5 mm que separan los polos, y la retardancia media de sus fibras. Esta idea tiene como fin medir la estabilidad del huso y relacionarlo con la calidad embrionaria. Hasta el momento se ha relacionado la cuantificación de la retardancia con la morfología de los pronúcleos (Shen et al., 2006), potencial de desarrollo en día 3 (Trimarchi et al., 2003) y formación de blastocisto (Rama Raju et al., 2007). El gran dinamismo de esta estructura y el valor relativo de la clasificación de pronúcleos, hace que sean necesarios más estudios que la relacionen con el potencial de implantación y desarrollo del embrión.

Estudios recientes de microscopía confocal ponen de manifiesto las limitaciones del valor predictivo de la microscopía de luz polarizada para valorar el grado de orden de las fibras del huso y la posición de los cromosomas en la rutina del laboratorio (Coticchio et al., 2009).

ZONA PELÚCIDA

La zona pelúcida está compuesta por tres glicoproteínas filamentosas (ZP1, ZP2, ZP3) que se entretrejen dando lugar a una estructura multilaminar. Las tres capas tienen birrefringencia con distinta retardancia y orientación. (Keefe et al., 1997).

Parece ser que la capa interna de la ZP es la que exhibe mayor birrefringencia

(Pelletier et al., 2004) y que el cultivo in vitro de los embriones altera el proceso normal de afinamiento de la ZP, afectando selectivamente la capa interna de ésta (Silva et al., 1997). Se han encontrado diferencias en la capa interna de la ZP en ciclos con fallo de fecundación (Shen et al., 2005) y se relaciona también con el potencial de desarrollo del embrión hasta blastocisto (Kilani et al., 2006; Rama Raju et al.,

incluyendo las de la ZP a través de la medida de su birrefringencia, así como el timing de maduración nuclear con la presencia y posición del huso.

Se observa el huso visible adyacente al corpúsculo polar y la zona pelúcida birrefringente. En el cuadrante inferior izquierdo el score automático de la cara interna de la zona pelúcida fruto de las mediciones de 180 puntos (verde).

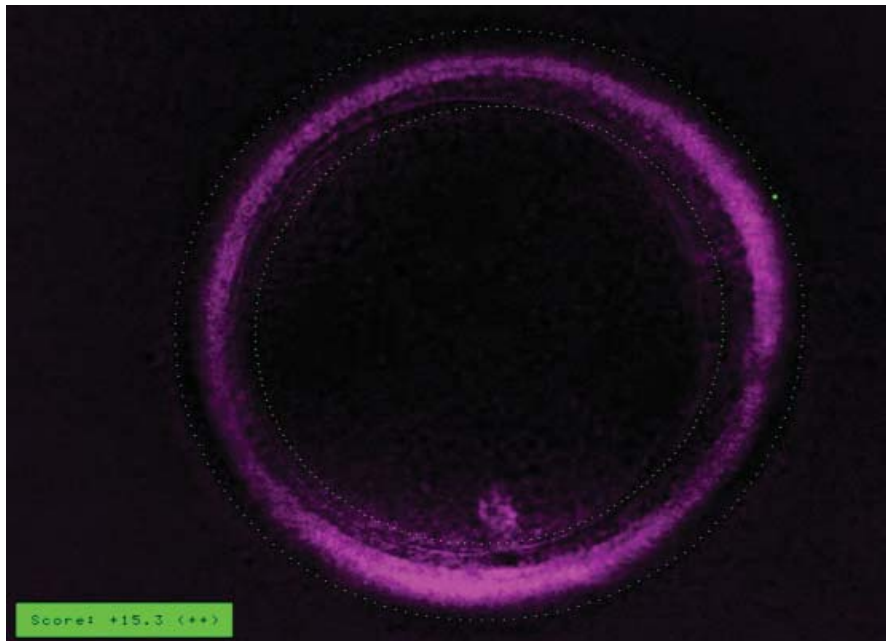


Figura 1. Imagen de un ovocito de maduración in vitro tomada con el sistema OCTAX PolarAide™ © (OCTAX PolarAide™, MTG, Germany)

2007). También se ha demostrado que embriones con mayor potencial de implantación tienen una mayor intensidad de birrefringencia de la ZP, y se han perfeccionado softwares que la cuantifican y proporcionan un score a cada ovocito (Montag et al., 2006; Madaschi et al., 2009) (Figura 1)

El endurecimiento y grosor de la ZP de los ovocitos varía también con la edad de la paciente. Se ha visto que los ovocitos de mujeres de edad avanzada presentan ZP menos refringentes y su relación con el potencial desarrollo hasta blastocisto ha corroborado la idea de que el estado de la ZP es un buen marcador de la calidad ovocitaria.

Con el fin de llevar a cabo una buena selección del embrión a transferir se deberá tener en cuenta tanto las características del ovocito,

Bolton VN, Hawes SM, Taylor CT, Parsons JH 1989 Development of spare human preimplantation embryos in vitro: an analysis of the correlations among gross morphology, cleavage rates, and development to the blastocyst. *Journal of In Vitro Fertility and Embryo Transfer*, 30–35.

Bromfield JJ, Coticchio G, Hutt K et al 2009 Meiotic spindle dynamics in human oocytes following slow-cooling cryopreservation *Hum. Reprod. Advance Access published May 2009*

Ciotti PM, Porcu E, Notarangelo L et al 2009 Meiotic spindle recovery is faster in vitrification of human oocytes compared to slow freezing *Fertil Steril* 91, 2399–2407.

Chamayou S, Ragolia A, Alecci C et al. 2006 Meiotic spindle presence and oocyte morphology do not predict clinical ICSI outcomes: a study of 967 transferred embryos. *Reprod BioMed Online* 13, 661–667.

Cohen Y, Malcov M, Schwartz T et al. 2004 Spindle imaging: a new marker for optimal timing of ICSI? *Hum Reprod* 19, 649–654.

Cooke S, Tyler JP, Driscoll GL 2003 Meiotic spindle location and identification and its effect on embryonic cleavage plane and early development. *Hum Reprod* 18, 2397–2405.

Coticchio G, Sciajno R, Hutt K et al 2009 Comparative analysis of the metaphase II spindle of human oocytes through polarized light and high-performance confocal microscopy *Fertil Steril [E pub]* June 2009

Ebner T, Moser M, Tews G 2006 Is oocyte morphology prognostic embryo developmental potential after ICSI? *Reproductive BioMedicine Online* 12, 507–12

Eichenlaub-Ritter U, Stahl A, Luciani JM. 1988 The microtubular cytoskeleton and chromosomes of unfertilized human oocytes aged in Vitro. *Hum Genet* 80, 259–264.

Fang C, Tang M, Li T et al. 2007 Visualization of meiotic spindle and subsequent embryo development in in-vitro and in-vivo matured human oocytes. *J Ass Reprod Genet* 24, 547–551.

Hassold T, Hunt P 2001 To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy.

BIBLIOGRAFÍA

Arroyo G., Martínez F, Tur R., Carrasco B., Belil I., Boada M., Coroleu B., Veiga A. (2007) Analysis of the meiotic spindle and zona pellucida of in vitro matured human oocytes with polarisation microscopy. *Abstracts of the 14th World Congress on In Vitro Fertilization & 3rd World Congress on In Vitro Maturation*, p. 151 (poster P-1292).

Almeida Ferreira Braga D, Cassia Savio Figueira R, Rodrigues D, et al. 2008 Prognostic value of meiotic spindle imaging on fertilization rate and embryo development in in vitro-matured human oocytes *Fertil Steril* 90, 429–433.

Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR 1996 Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Human Reproduction* 11, 2217–2222.

Nature Reviews Genetics 2, 280–291.
Henderson SA, Edwards RG 1968 Chiasma frequency and maternal age in mammals. Nature 217, 22–28.

Kilani SS, Cooke S, Kan AK, Chapman MG 2006 Do age and extended culture affect the architecture of the zona pellucida of human oocytes and embryos? Zygote 14, 39–44.

Keefe DK, Tran P, Pelligrini C 1997 Polarized light microscopy and digital image processing identify a multilaminar structure of the hamster zona pellucida. Human Reproduction 12, 1250–1252.

Liu L, Trimarchi JR, Oldenbourg R, Keefe DL 2000 Increased birefringence in the meiotic spindle provides a new marker for the onset of activation in living human oocytes. Biology of Reproduction 63, 251–258.

Madaschi C, Carvalho de Souza Bonetti T, Paes de Almeida Ferreira Braga D et al. 2008 Spindle imaging: a marker for embryo development and implantation. Fertil Steril 90, 194–198.

Mailhes JB and Yuan ZP 1987 Differential sensitivity of mouse oocyte to Colchane-induced aneuploidy. Environ Mol Mutagen 10, 183–189.

Montag M, Schimming T, van der Ven H 2006 Spindle imaging in human oocytes: the impact of the meiotic cell cycle. Reprod BioMed Online 12, 442–446.

Moon JH, Hyun CS, Lee SW et al. 2003 Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using the PolScope enables the prediction of embryonic developmental competence after ICSI. Hum Reprod 18, 817–820.

Oldenbourg R 1999 Polarized light microscopy of spindles. Methods in Cellular Biology 61, 175–208.

Pickering S, Braude P, Johnson MH et al. 1990 Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. Fertil Steril 54, 102–108.

Pelletier C, Keefe DL, Trimarchi JR 2004 Noninvasive polarized light microscopy quantitatively distinguishes the

multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos. Fertil Steril 81, 850–856.

Plachot M, Selva J, Wolf JP et al 2002 Consequences of oocyte dysmorphism on the fertilization rate and embryo development after intracytoplasmic sperm injection. A prospective multicenter study. Gynecology Obstetrics and Fertility 30, 772–779.

Rama Raju GA, Prakash GJ, Krishna KM, Madan K 2007 Meiotic spindle and zona pellucida characteristics as predictors of embryonic development: a preliminary study using PolScope imaging. Reprod BioMed Online 14, 166–174.

Rienzi L, Ubaldi F, Martinez F et al. 2003 Relationship between meiotic spindle location with regard to polar body position and oocyte developmental potential after ICSI. Hum Reprod 18, 1289–1293.

Rienzi L, Martinez F, Ubaldi F et al. 2004 PolScope analysis of meiotic spindle changes in living metaphase II human oocytes during the freezing and thawing procedures. Hum Reprod 19, 655–659.

Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M et al. 2005 Meiotic spindle visualization in living human oocytes. Reprod BioMed Online 10, 192–198.

Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A et al. 1997 Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. Human Reproduction 12, 1267–1270.

Shen Y, Stalf T, Mehnert C et al. 2005 High magnitude of light retardation by the zona pellucida is associated with conception cycles. Hum Reprod 20, 1596–1606.
Shen Y, Stalf T, Mehnert C et al. 2006 Light retardance by human oocyte spindle is positively related to pronuclear score after ICSI. Reprod BioMed Online 12, 737–751.

Shen Y, Betzendahl I, Hans-Tinneberg R et al. 2008 Enhanced polarizing microscopy as a new tool in aneuploidy research in oocytes. Mutation Research 651, 131–140

Silva CS, Kapura K, Oldenbourg R, Keefe DL 1999 The first polar body does not predict accurately the location of the metaphase II meiotic spindle in mammalian oocytes. Fertil Steril 71, 719–721.

Steuerwald NM, Steuerwald MD, Mailhes JB 2005 Post-ovulatory aging of Mouse oocytes leads to decreased MAD2 transcripts and increased frequencies of premature centromere separation and anaphase. Hum Reprod 11, 623–630.

Trimarchi JR, Karin RA, Keefe DL 2005 Average spindle retardance observed using the PolScope predicts cell number in day 3 embryos. Fertil Steril 82 (Suppl. 2), S268.

Ubaldi F, Rienzi L 2008 Morphological selection of gametes. Placenta 29, S115–S120.

Wang WH, Meng L, Hackett RJ et al. 2001a Limited recovery of meiotic spindles in living human oocytes after cooling–re-warming observed using polarized light microscopy. Hum Reprod 16, 2374–2378.

Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Keefe DL 2001b Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spindles imaged by PolScope before insemination. Hum Reprod 16, 1464–1468



COMPROMETIDOS CON
LA INNOVACIÓN EN DGP

pgdteam@reprogeneticsspain.com
T+34 93 241 77 24

NUEVOS TESTS DE DETECCIÓN DE ANEUPLOIDÍAS ESPECÍFICOS PARA EDAD MATERNA AVANZADA (AMA) Y ABORTOS DE REPETICIÓN (RAB)

REALIZAMOS

Test de aneuploidías
Reorganizaciones cromosómicas
y enfermedades monogénicas

OFRECEMOS

Programación inmediata
Alta experiencia
Continúa innovación tecnológica

EXPERIENCIA

> 16.500 ciclos
(Enero 2009)

DIRECTORES CIENTÍFICOS

USA Santiago Munné - Jacques Cohen
SPAIN Mireia Sandalinas - Carles Giménez
UK Dagan Wells

MITOS Y LEYENDAS EN EL LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA CLÍNICA: EFECTO PERJUDICIAL DE LA LUZ DEL LABORATORIO SOBRE LOS EMBRIONES HUMANOS (A FAVOR).

Emilio Gómez Sánchez e Inmaculada Torres González

TAHE FERTILIDAD. Avd de Europa nº 11- Bajo. 30007 Murcia

E-mail: emilio@tahe.es

INTRODUCCIÓN

A finales de los años 90 se inició un debate en el mundo de la embriología clínica sobre si la luz era perjudicial o no para los gametos y embriones que manejamos en el laboratorio de fecundación in vitro. De repente pareció lógico pensar que si tanto gametos como embriones no estaban expuestos a la luz de forma natural, la exposición artificial a ésta en el laboratorio podría ser dañina para su integridad y por tanto para la capacidad de desarrollo e implantación de los embriones. No se presentaron pruebas irrefutables ni a favor ni en contra de esta afirmación, así que unos decidimos trabajar con poca luz y otros continuaron haciéndolo con la luz encendida o incluso con ventanas en el laboratorio. ¿Qué es mejor? Yo personalmente creo que es acertado trabajar con un bajo nivel de luz ambiental en los laboratorios de embriología clínica y voy a intentar demostrarlo con la bibliografía existente.

LUZ, GAMETOS Y EMBRIONES

En condiciones naturales la fecundación se produce en el interior de la trompa de Falopio, por tanto ni ovocitos, ni espermatozoides, ni embriones se exponen nunca a la luz solar o a una fuente artificial de luz, así que no disponen de un sistema de protección frente a la luz, por lo que parece lógico pensar que la exposición de gametos y embriones a la luz en el laboratorio es un factor estresante y que puede perjudicar la capacidad implantatoria de estas células. Esto contrasta con lo que ocurre con los gametos de muchos animales ovíparos, como peces y anfibios, que pueden recibir directamente la luz solar durante la fecundación y el desarrollo. Para evitar

los daños que podría ocasionar la radiación solar sobre ellos, estos gametos y embriones han desarrollado diversos mecanismos de protección. La principal adaptación que permite que gametos y embriones reciban directamente rayos ultravioleta es la incorporación de compuestos que absorben las radiaciones UV-A y UV-B. Así, el aminoácido micosporina es un ejemplo de éstos; prueba de su función protectora es que los embriones de erizo de mar con niveles bajos de él en la dieta son más susceptibles a los daños producidos por los rayos UV que los embriones con altos niveles. En la Antártida, donde hay altos niveles de rayos UV-A, algunas especies de erizos de mar producen huevos que se hunden hasta el fondo, de manera que no son alcanzados por los rayos solares, permaneciendo así protegidos de ellos.

Desde finales de los años 70 se han realizado estudios sobre el efecto de la luz en gametos y embriones en cultivo in Vitro. En 1978 Hirao y Yanagimachi demostraron que los ovocitos de hámster son muy vulnerables a la luz, y su meiosis se ve afectada por la luz visible de baja longitud de onda emitida por las lámparas fluorescentes frías que se utilizan normalmente en los laboratorios. Bedford y Dobrinis (1989) publicaron que la exposición de ovocitos y cigotos de conejo a luz blanca fría no produjo un efecto negativo sobre el desarrollo embrionario. La división embrionaria de los embriones de hámster se reduce con el mismo tipo de luz (Umaoka et al, 1992; Yamauchi Y et al, 2002). Además, la utilización de habitaciones con bajo nivel de luz es clave para que un programa de fecundación in Vitro de hámster tenga éxito (Yamauchi Y et al, 2002). Más recientemente, Takenaka y colaboradores (2007) expusieron

cigotos de hámster y de ratón a luz fría blanca, observando que el desarrollo hasta blastocisto se detenía en los de hámster pero no en los de ratón. Cuando se transferían los blastocistos de ratón, la tasa de implantación era más baja en los blastocistos provenientes de cigotos expuestos a la luz que en los que no se habían expuesto a ella. Nematollahi-mahani y colaboradores (2009) expusieron embriones de ratón de 2 células a 1600 lux de luz visible durante diferentes tiempos y encontraron que después de 45 minutos de exposición la división embrionaria se veía afectada. Cuando embriones de 2 células de hámster se expusieron a diferentes intensidades de luz durante 10 minutos, se comprobó que con 200 lux había un mayor desarrollo embrionario hasta blastocisto. Al analizar el efecto de diferentes longitudes de onda sobre el desarrollo embrionario, se detectó que la luz azul (445-500nm) era la más perjudicial provocando la producción de más radicales libres y la presencia de más células apoptóticas en el blastocisto.

De todos los artículos publicados se puede deducir que ovocitos y embriones de la mayoría de los mamíferos son sensibles a la luz, siendo el hámster el ejemplo de animal cuyos ovocitos son más afectados por la luz.

¿CÓMO AFECTA LA LUZ A LA CALIDAD DE GAMETOS Y EMBRIONES?

Desde hace bastante tiempo se sabe que la luz ultravioleta (300-400nm) y la luz azul (400-500 nm) provocan la producción de radicales libres de oxígeno, como el H₂O₂ en el interior de las células, que a su vez dañan las proteínas, los lípidos y el ADN celular (Squirrell et al, 1999; Hockberger et al, 1999). Aunque la luz visible de longitud

de onda corta (400-450 nm) de las lámparas fluorescentes de luz blanca es menos dañina que la luz UV, la exposición prolongada de ovocitos y embriones de mamíferos a ésta podría provocar los mismos efectos perjudiciales sobre el desarrollo o la capacidad de implantación (Takenaka et al 2007).

¿QUÉ PODEMOS HACER EN EL LABORATORIO FIV PARA EVITAR QUE LA LUZ DAÑE A GAMETOS Y EMBRIONES?

En el laboratorio de FIV gametos y embriones reciben luz de diferentes fuentes: la luz del laboratorio propiamente dicha, la luz solar si hay ventanas, la luz de las campanas de flujo laminar y la luz de microscopios y estereomicroscopios. Para evitar el daño producido por la luz, en primer lugar deberemos trabajar con baja luz ambiente, para lo cual no tendremos ventanas en el laboratorio y las luces dispondrán de reguladores de potencia. No utilizaremos la luz de las cabinas de flujo laminar cuando en ellas haya gametos o embriones, y por último ajustaremos la luz del microscopio o estereomicroscopio al mínimo posible para trabajar, además de utilizar filtros para la luz azul.

CONCLUSIÓN

Los gametos y embriones de los mamíferos no tienen ningún mecanismo de defensa frente a la luz solar o artificial y ésta les afecta produciendo radicales libres del oxígeno en su interior, por lo que sería aconsejable eliminar en lo posible las fuentes de luz dentro de un laboratorio de fecundación in Vitro.

BIBLIOGRAFÍA:

Bedford JM, Dobrenis A. Light exposure of oocytes and pregnancy rates after their transfer in the rabbit. *J Reprod Fert* 1989; 85: 477-481.

Hirao Y, Yanagimachi R. Detrimental effect of visible light on meiosis of mammalian eggs in vitro.

J Exp Zool 1978; 206:365-369. Hockberger P, Skimina T, Centonze V, Lavin C, Chu S, Dadras S, et al. Activation of flavin-containing oxidases underlies light-induced production of H2O2 in mammalian cells. *PNAS* 1999; 96: 6255-6260.

Nematollahi-mahani SN, Pahang H, Moshkdanian G, Nematollahi-mahani A. Effect of embryonic fibroblast cell co-culture

on development of mouse embryos following exposure to visible light. *J Assist Reprod Genet* 2009; 26:129-135.

Oh SJ, Gong SP, Lee ST, Lee EJ. Light intensity and wavelength during embryo manipulation are important factors for maintaining viability of preimplantation embryos in vitro. *Fertility and Sterility* 2007; 88, Suppl: 1150-1157.

Squirrel JM, Wokosin DL, White JG, Bavister BD. Long-term two-photon fluorescence imaging of mammalian embryos without compromising viability. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 763-767.

Takenaka M, Horiuchi T, Yanagimachi R. Effects of light on development of mammalian zygotes. *PNAS* 2007; 104: 14289-14293.

Umaoka Y, Noda Y, Nakayama T, Narimoto K, Mori T, Iritani A. Effect of visual light on in vitro embryonic development in the hamster. *Theriogenology* 1992; 38: 1043-1054.

Yamauchi Y, Yanagimachi R, Horiuchi T. Full-term development of golden hamster oocytes following intracytoplasmic sperm head injection. *Biol Reprod.* 2002; 67:534-539.

MITOS Y LEYENDAS EN EL LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA CLÍNICA: EFECTO PERJUDICIAL DE LA LUZ DEL LABORATORIO SOBRE LOS EMBRIONES HUMANOS (EN CONTRA).

Antonio Urries⁽¹⁾, Carolina Roméu⁽¹⁾, Montse Lierta⁽¹⁾, Cristina Calzada⁽²⁾

⁽¹⁾Reproducción Asistida Quirón Zaragoza, ⁽²⁾ Departamento de Prevención Quirón Zaragoza

E-mail: aurries.zar@quiron.es

INTRODUCCIÓN

Está claro que el fin último de todos los que trabajamos en Reproducción Asistida es el de intentar obtener embriones sanos con alta capacidad implantatoria. Todos igualmente coincidiremos en que, para ello, debemos extremar los cuidados durante las primeras etapas de desarrollo del embrión generado in vitro, etapas en las que se encuentra particularmente

vulnerable frente a posibles agresiones del entorno que le rodea.

Naturalmente esto no es nuevo, ya en 1988 Schumacher publicaba en el *Journal of Reproduction and Fertility* un trabajo titulado Influence of visible light and room temperature on cell proliferation in preimplantation rabbit embryos en el cuál constataban el efecto perjudicial de la luz visible y de la temperatura ambiental sobre el

desarrollo celular de los embriones de ratón. Con ello se abrió la veda y poco a poco, al amparo de otros trabajos que fueron apareciendo en la década de los 90, fuimos tomando nota. Aflojamos una bombilla, luego otra y así hasta acabar convirtiendo nuestros laboratorios en auténticas cuevas.

A lo largo de esta charla no voy a intentar quitarle importancia al efecto nocivo de la luz. Tiene importancia. Al

igual que la tiene la temperatura, la presencia de compuestos orgánicos volátiles, el estrés generado por el pipeteado de los embriones o lo limpio y aseado que sea el embriólogo, pero si que voy a cuestionar la forma como se ha intentado solucionar. Excesiva según mi punto de vista. Como vulgarmente se dice "matando moscas a cañonazos". Sin olvidar tampoco que al disminuir de forma tan drástica las luces de nuestros laboratorios estamos empeorando nuestras condiciones de trabajo, incrementando la posibilidad de errores y/o accidentes e incluso, posiblemente, perjudicando nuestra propia salud ocular.

¿Y ninguno de los directores de laboratorio que puedan estar leyendo esto han pensado nunca que pueden estar incurriendo en delito al incumplir la normativa existente sobre prevención, seguridad y salud en los lugares de trabajo, con las subsiguientes demandas y sanciones que ello podría conllevar?.

A continuación voy a intentar presentar suficientes argumentos para convenceros de que para matar una mosca sólo hace falta un dedo, y de que, como dice Lars D.M. Ottosen, y yo comparto, "the use of dark laboratories is not justified".

DISCUSIÓN

¿A QUÉ NOS PARECEMOS MÁS? ¿AL RATÓN O AL CONEJO?.

Hamster, conejos, vacas, ratones...

Todos los estudios revisados muestran altas variaciones según el mamífero objeto de estudio. Los embriones de hamster tienen una sensibilidad excepcionalmente elevada a la luz, mientras que los de conejo son altamente resistentes (Oh et al 2007, Takenaka et al. 2007).

La diferencia puede estar relacionada con el momento de activación del genoma, distinto según las especies. Dicho momento supone una dramática reprogramación de la expresión génica esencial para su desarrollo posterior (Schultz 2007). Curiosamente en los embriones de ratón esa activación se

produce en el estadio de 1-2 células (Flach 1982), mientras que en el conejo esto ocurre con 8 células (Manes 1971).

Dado que en los embriones humanos tal activación se produce en estadio de 6-8 podríamos pensar que estamos más cerca de la respuesta del conejo que la del ratón, y con ello en el grupo de los "altamente resistentes".

OOCITOS Y EMBRIONES A LA PLANCHA

¿Cuánto tiempo de exposición es necesario para notar los efectos negativos sobre los embriones?

Takenaka sometió a los embriones de hamster un largo minuto de exposición a la luz del sol (¡¡¡20.000 luxes!!!) para determinar que es catastrófica para su desarrollo.

En 1992 Barlow expuso a los ovocitos maduros de ratón, previo a su fertilización, a intensidades de luz visible de 4000 luxes durante 1, 2 ó 4 horas y no encontró diferencias con el grupo control, que había estado protegido de la luz, en cuanto a tasa de división, tasa de implantación y normalidad fetal.

En los estudios de Takenaka los cigotos se mantuvieron durante 15 minutos a una exposición de 1200 luxes de luz fluorescente blanca fría, observando que ninguno de ellos se desarrollaba más allá de dos células. La luz fluorescente blanca fría es especialmente deletérea para el desarrollo embrionario.

GAFAS DE CARTÓN NEGRO PARA EVITAR LA MALA UV-A DE LA LUZ SOLAR O CÓMO MATAR MOSCAS A CAÑONAZOS.

Está claro que ante la duda lo más cómodo ha sido apagar la luz de nuestros laboratorios (clic y ya está), pero no parece que sea lo más adecuado, al igual que no es lógico querer evitar la luz solar poniéndonos una cartulina negra delante de los ojos.

Para empezar no debemos olvidar que el 95% de la radiación que recibe el embrión en su manipulación proviene de las luces halógenas de los microscopios (Ottosen et al. 2007) y más del 90% de esta radiación es de longitudes de onda >500 nm.

Por otro lado es bien sabido que la luz con longitudes de onda de entre 300-500 nm es la que puede producir daños en el ADN (Schultz 2007), por lo que sería ese 10% de radiación restante la que originaría los efectos deletéreos sobre el embrión.

Esto nos llevaría a dos conclusiones:

La primera es que colocando filtros sobre las fuentes de luz de los microscopios que eliminen las longitudes de onda <500 nm se solucionaría el problema. (Korhonen et al. 2009)

Y segundo, que la influencia luminosa que pueda tener la luz ambiental de nuestros laboratorios es prácticamente nula, por lo que el mantenerlos a oscuras o poco iluminados no es práctico y totalmente innecesario (Takenaka et al. 2007; Ottosen et al. 2007).

Pero esto no es nuevo, ya lo dijo Yanagimachi en 1978 cuando propuso tapar las fuentes de luz de los microscopios con celofán rojo para minimizar los efectos deletéreos de la luz visible sobre la meiosis de los huevos de mamíferos cultivados in vitro.

Posiblemente podamos poner unas simples gafas de sol a nuestros laboratorios y quitar las cartulinas negras que les hemos puesto.

¿QUÉ ES PRIMERO, EL EMBRIÓN O EL EMBRIÓLOGO?

¿Y que pasa respecto a nuestra salud? Los ópticos manifiestan continuamente que una iluminación insuficiente origina que el trabajador deba acercar la vista a una distancia menor que la normal (30 cms), lo que puede producir miopía y otros trastornos visuales como hiperemia conjuntival, lagrimeo y nistagmo, además de fatiga ocular, cansancio, dolor de cabeza, estrés y accidentes/errores.

Por otra parte, el excesivo contraste lumínico que sufrimos cuando pasamos de la luz intensa del microscopio a la semioscuridad ambiental que nos rodea también es peligroso, ya que nos puede generar disminución de la agudeza visual y de la capacidad acomodaticia del

ojo. Todo esto puede tener como consecuencia cegueras temporales, mientras el ojo se adapta a la nueva iluminación. Es el mismo motivo por el cual se recomienda no ver la televisión totalmente a oscuras.

Por último, la falta de una buena iluminación obliga en ocasiones a adoptar posturas inadecuadas desde el punto de vista ergonómico.

NISTAGMUS DE LOS EMBRIÓLOGOS. NUEVA ENFERMEDAD PROFESIONAL.

Un poco de historia: En 1910 el Dr. M Liébert presentó en el II Congreso Internacional de Enfermedades Profesionales en Bruselas los resultados de un estudio encargado por el Servicio de Inspección de Minas Belga con motivo de haber observado una incidencia elevada de la enfermedad del Nistagmus en sus mineros.

Dicha enfermedad se caracterizaba por movimientos rotatorios o bien horizontales, rápidos e incontrolados de los ojos, que aparecían con los cambios de luz-oscuridad o al mirar hacia arriba estando agachados. Los afectados sufrían deslumbramiento ante cualquier luz brillante, además de trastornos nerviosos, temblores de cabeza y de manos, dificultades de agudeza visual para la visión binocular, pudiendo llegar a caerse por pérdida de equilibrio.

El estudio, realizado sobre 1412 mineros de la cuenca hullera de Lieja, mostró que 217 estaban afectados de dicha enfermedad, lo que suponía un 19,2% .

A lo largo de dicho congreso se llegó a afirmar que dicha enfermedad "podía ser considerado el gran proveedor de accidentes de trabajo, pudiendo ser excepcionalmente la causa de grandes catástrofes " (Dransart M). Igualmente se constató que la enfermedad aparecía principalmente en mineros de 30-45 años que llevaban de 6 a 10 años de trabajo en la mina y como probable causa una iluminación insuficiente y la "actitud encorvada que el minero debe de adoptar en el fondo de la mina".

En el debate surgido a raíz de la presentación de este trabajo, M. Giglioli recordó "haber publicado dos casos de

esta afección en un obrero pintor y en un calderero. Los dos trabajaban como los mineros, en una posición molesta y anormal y en condiciones de iluminación insuficientes". ¿Os suena de algo?

NOTA: En el año 1951 fue incluida en el cuadro de enfermedades profesionales del Gobierno de España el Nistagmus de los Mineros (Código 2N0101), aunque actualmente es una enfermedad que está desapareciendo gracias a los nuevos sistemas de iluminación de las minas.

¿Nistagmus de los Embriologos para dentro de 50 años?

ACORDAROS PARA EL FUTURO: REAL DECRETO 5/2000. LEY SOBRE INFRACCIONES Y SANCIONES. INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL TRABAJO. GOBIERNO DE ESPAÑA.

El Real Decreto 486/1997, por el que se establecen las disposiciones mínimas de seguridad y salud en los lugares de trabajo, desarrollado en la Guía Técnica para la Evaluación y Prevención de los Riesgos Relativos a la Utilización de los Lugares de Trabajo, establece en su Artículo 8. (Iluminación) que "La iluminación de los lugares de trabajo deberá permitir que los trabajadores dispongan de condiciones de visibilidad adecuadas para poder circular por los mismos y desarrollar en ellos sus actividades sin riesgo para su seguridad y salud".

Posteriormente, en dicha Guía Técnica en su anexo A. (Tablas de Iluminación), establece que los laboratorios deben de mantener un nivel medio de iluminación sobre el área de trabajo de 500 luxes.

Para finalizar, recalcar que "el empresario deberá adoptar las medidas necesarias para que la utilización de los lugares de trabajo no origine riesgos para la seguridad y salud de los trabajadores.... y los lugares de trabajo deberán cumplir las disposiciones mínimas establecidas en el Real Decreto en cuanto a...iluminación..."

Todo esto puede llevar consigo posibles sanciones por negligencia en caso de que en un futuro se confirmaran efectos perjudiciales en la salud por la realización de una actividad laboral en

unas condiciones que incumplen la normativa vigente sobre "disposiciones mínimas de seguridad y salud en los lugares de trabajo". Sanciones obviamente sobre los empresarios, pero que finalmente recaerían sobre los Responsables(as)/Directores(as)/Jefes(as) de los Laboratorios.

Y según el Real Decreto 5/2000, que os recomiendo recordar, en su sección 2ª, artículo 11, punto 4, manifiesta que son Infracciones Leves "las que supongan incumplimientos de la normativa de prevención de riesgos laborales, siempre que carezcan de trascendencia grave para la integridad física o la salud de los trabajadores".

Pero no olvidemos que una Infracción Leve puede transformarse en Muy Grave en caso de no corregir la anomalía y que finalmente, fruto de ese incumplimiento de la normativa, se haya originado un riesgo grave para la seguridad y salud del trabajador". (artículo 13, punto 10).

Actualmente las infracciones en materia de prevención de riesgos laborales se sancionan con cantidades que, en su grado máximo, alcanzan los 819.780 euros. Y cancelación de la acreditación otorgada por la autoridad laboral.

Para el Gobierno de España es primero el Embriólogo al Embrión.

CONCLUSIÓN.

Una intensidad luminosa moderada en los microscopios (aprox 200 luxes) con filtros que eliminen longitudes de onda inferiores a 500 nm y reducir el tiempo de exposición de los embriones al mínimo posible debería permitirnos mantener una luz ambiente suficientemente confortable y acorde con la normativa vigente. Debiendo extremar las precauciones únicamente en el momento de realización de cualquier tipo de micromanipulación (ICSI, DGP,...). A lo largo del Debate se incidirá más profundamente en este tema.

BIBLIOGRAFÍA

Barlow P, Puissant F, Van der Zwalmen P, Vandromme J, Trigaux P, Leroy F. In vitro fertilization, development, and

implantation after exposure of mature mouse oocytes to visible light. *Mol Reprod Dev.* 1992; 33(3): 297-302.

Comité Europeo Normalizador. Informe Técnico CENTC 169.

Gobierno de España. Real Decreto 486/1997, de 14 de abril, por el que se establecen las disposiciones mínimas de seguridad y salud en los lugares de trabajo.

Gobierno de España. Real Decreto Legislativo 5/2000, de 4 de agosto, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley sobre Infracciones y Sanciones en el Orden Social.

Gobierno de España. Real Decreto 1299/2006, de 10 de noviembre, por el que se aprueba el cuadro de enfermedades profesionales en el sistema de la Seguridad Social y se establecen criterios para su notificación y registro.

Hirao Y, Yanagimachi R. Detrimental effect of visible light on meiosis of mammalian eggs in vitro. *J Exp Zool.* 1978; 206 (3): 365-369.

Junceda J, Muro JI. Iluminación y factores asociados en el nistagmus de los mineros.

Anales de la Sociedad de Ergofoftalmología Española, 1975; 4 (4): 227-239.

Korhonen K, Sjövall S, Viitanen J, Ketpja E, Makarevich A, Peippo J. Viability of bovine embryos following exposure to the green filtered or wider bandwidth light during in vitro embryo production. *Human Reproduction* 2009; 24 (2): 308-314.

Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales España. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo. Guía Técnica para la Evaluación y Prevención de los Riesgos Relativos a la Utilización de los Lugares de Trabajo.

Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales España. Iluminación de los centros de trabajo. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo. NTP 211.

Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales España. Pantallas de Visualización de Datos: condiciones de iluminación. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo. NTP 252.

Oh SJ, Gong SP, Lee ST, Lee EJ, Lim JM. Light intensity and wavelenght during embryo manipulation are important factors for maintainig viability of preimplantation

embryos in vitro. *Fertility and Sterility* 2007; 88 (2): 1150-1157.

Ottosen LDM, Hindkjaer J. Light exposure of the ovum an preimplantation embryo during ART procedures. *J Assist Reprod Genet* 2007; 24: 99-103.

Ruiz M, Calatayud M, Vila M. Mejora de los resultados en el laboratorio de Reproducción Asistida. *Act Obst Gin* 2008; (on line).

Schultz RM. Of light and mouse embryos: Less is more. *PNAS* 2007; 104:14547-14548.

Schumacher A, Fischer B. Influence of visible light and room temperature on cell proliferation in preimplantation rabbit embryos. *J Reprod Fert* 1988; 84: 197-204.

Takenaka M, Horiuchi T, Yanagimachi R. Effects of light on development of mammalian zygotes. *PNAS* 2007; 104: 14289-14293.

Ubeda y Corral J. II Congreso Internacional de Enfermedades Profesionales; 910 Sep10-14; Bruselas, Bélgica.

INCIDENCIA DE ANOMALÍAS EPIGENÉTICAS DE LOS LOCI H19 Y SNRPN EN ESPERMATOZOIDEOS DE INDIVIDUOS QUE CONSULTAN POR PROBLEMAS DE FERTILIDAD.

Marta Pladevall, Cristina Camprubí, Joan Blanco
 Unidad de Biología Celular, Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Facultad de Biociencias. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès).
 E-mail: marta.pladevall@uab.cat

INTRODUCCIÓN

IMPRONTA GENÓMICA

La impronta genómica es una marca epigenética heredable y reversible que implica la inactivación específica de determinados genes en función de su origen parental. Se establece mediante la metilación de dinucleótidos 5'-CG-3' y modificaciones covalentes en las histonas que conllevan cambios conformacionales de la cromatina

bloqueando la expresión del alelo materno o paterno (expresión monoalélica). El carácter heredable y reversible se manifiesta en la línea germinal donde la impronta se borra y se vuelve a establecer durante la gametogénesis en función del sexo del individuo y para cada gen en particular (Figura 1). Este mecanismo asegura que después de la fecundación sean heredadas la copia paterna metilada y la materna desmetilada o al revés. En hombres, el patrón de metilación se

establece en espermatogonias para la mayoría de genes estudiados, (Kerjean et al., 2000; Manning et al., 2001). En la ovogénesis el proceso parece ser asincrónico. Algunos estudios proponen que la metilación se establece alrededor de la fecundación (El-Maarri et al., 2001), mientras que en otros se propone que la impronta materna se ha completado en ovocitos maduros (Geuns et al., 2003). Después de la fecundación la impronta genómica se mantiene en todas las células somáticas del embrión

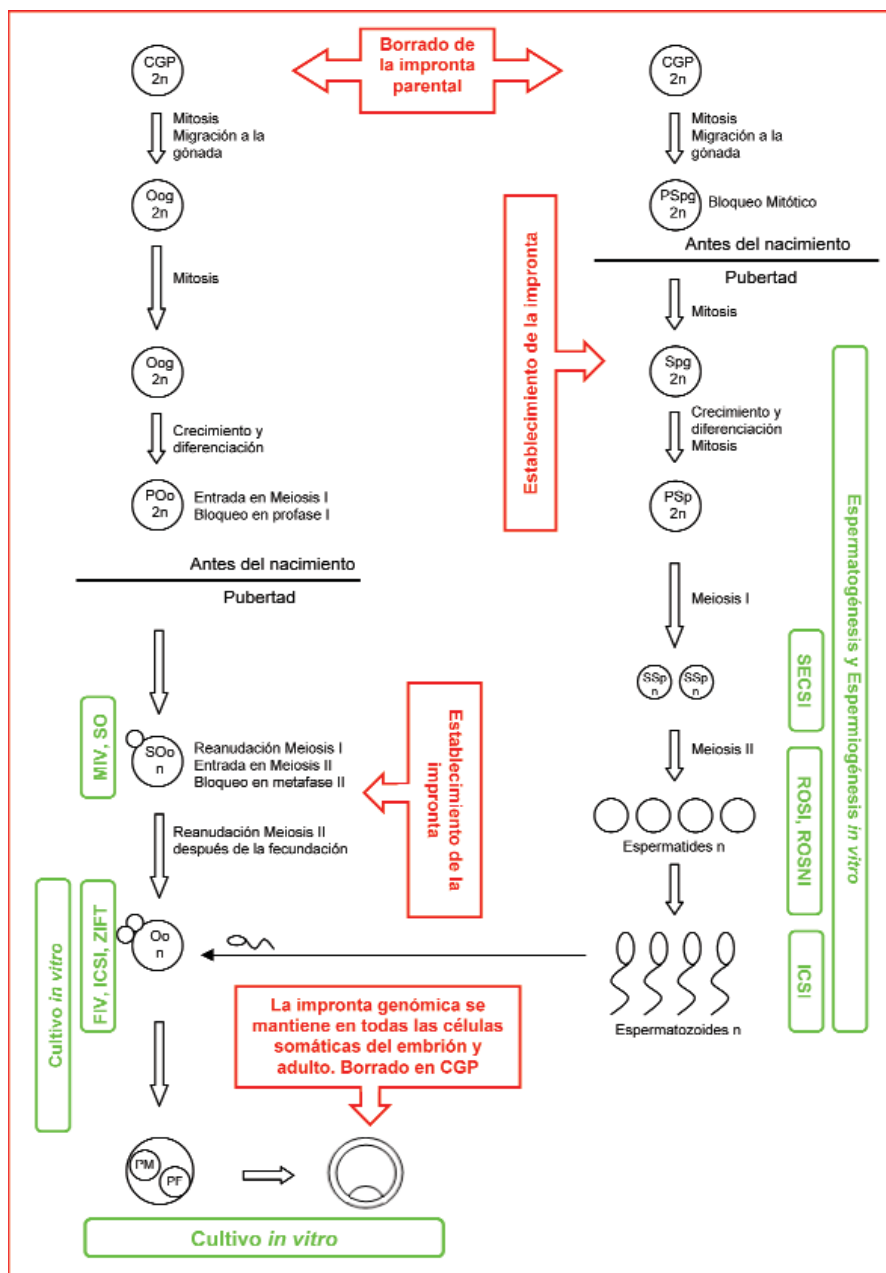


Figura 1. Esquema donde se representa la gametogénesis femenina y masculina relacionada con los distintos acontecimientos en la impronta genómica durante este período (en rojo) y las técnicas de reproducción asistida (en verde). CGP: células germinales primordiales, Oog: ovogonia, POo: ovocito primario, SOo: ovocito secundario, Oo: ovocito maduro, PM: pronúcleo masculino, PF: pronúcleo femenino, PSPg: proespermatogonia, Spg: espermatogonia, PSp: espermatoцитo primario, SSp: espermatoцитo secundario, SO: superovulación, MIV: maduración in vitro, FIV: fecundación in vitro, ICSI: intracytoplasmic sperm injection, ZIFT: zygote intrafallopian transfer, SECSI: secondary spermatocyte injection, ROSI: round spermatid injection, ROSNI: round spermatid nucleous injection. (Figura adaptada de Laprise, 2009).

y del individuo adulto para borrarse de nuevo únicamente en células germinales primordiales.

En humanos se conocen aproximadamente 80 genes regulados por impronta genómica. Muchos de ellos se encuentran relacionados con el crecimiento y desarrollo del embrión y la placenta así como con desarrollo de funciones neurológicas. Así pues, alteraciones en el establecimiento y/o

mantenimiento de la impronta genómica se encuentran relacionadas con la aparición de enfermedades que conllevan anomalías del crecimiento pre y postnatal y alteraciones en las funciones neurológicas (Murphy and Jirtle, 2003). A modo de ejemplo, alteraciones epigenéticas de los genes regulados por impronta genómica presentes en la sub-banda 11p15.5 conllevan el desarrollo del síndrome de Beckwith-Wiedeman (SBW) o Silver-

Russell (SRS) y anomalías epigenéticas de los genes presentes en la región 15q11-q13 conllevan el desarrollo del síndrome de Prader-Willi (SPW) o Angelman (SA).

RELACIÓN ENTRE TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA (TRA) Y ALTERACIONES EN LA IMPRONTA GENÓMICA

Existen numerosas revisiones que sugieren una posible relación entre TRA y un incremento de las alteraciones de la impronta genómica en la descendencia concebida mediante estas técnicas (Cox et al., 2002; DeBaun et al., 2002; Orstavik et al., 2003; Niemitz et al., 2004; Halliday et al., 2004). La conexión reside en la posible interferencia que podrían causar los distintos procedimientos utilizados en reproducción asistida en el ciclo de reprogramación de la impronta genómica en los gametos y el mantenimiento de ésta en las primeras etapas del desarrollo embrionario (figura 1). Diferentes hipótesis no excluyentes entre sí y basadas en el conocimiento de los mecanismos responsables en el establecimiento y mantenimiento de la impronta genómica, han sido formuladas por diferentes investigadores intentando explicar estos resultados. Una de las hipótesis relaciona la superovulación y la maduración in vitro de ovocitos como posibles mecanismos de interferencia para el correcto establecimiento de la impronta durante la ovogénesis (Ludwig et al., 2005; Borghol et al., 2006). También existen trabajos con modelos animales que relacionan la manipulación y el cultivo in vitro de embriones con la presencia de defectos de impronta genómica (Khosla et al., 2001; Li et al., 2005; Mann et al., 2004; Lawrence and Moley, 2008). Otros sugieren que anomalías en la impronta genómica en los espermatozoides de individuos infértiles sean la causa del fenotipo infértil. Se han presentado trabajos que avalan experimentalmente una relación entre recuentos espermáticos bajos y la presencia de anomalías en distintos genes regulados por impronta genómica (Marques et al., 2004; 2008; 2009; Kobayashi et al., 2007).

Existen aproximaciones experimentales que permiten valorar la presencia de

Locus	Cebador	Secuencia	Nucleótidos	Nº Acceso GenBank
H19	H19F ^a	5'-AGGGTGTTTTAGTTTTATGGATGATGG-	6006-6032	AF087017
	H19R ^a	5'-TCCTATAAATATCCTATCCCAAATAAGC-	6299-6328	AF087017
	P-H19F ^{**}	5'-AGGGTTTTTGGTAGGTATAGAGTT-	6064-6087	AF087017
	PBT-H19R ^{**}	5'-TCCTATAAATATCCTATCCCAAAT-	6304-6328	AF087017
SNRPN	SNRPNF ^{**}	5'-TTATTGTAATAGTGTGGGG-3'	131151-131173	NC 000015
	SNRPNR ^{**}	5'-CTCCAAAAACAAAACTTTAAAA-3'	131524-131546	NC 000015
	P-SNF [*]	5'-TGTGGGGTTTTAGGGGTTAGT-	131166-131187	NC 000015
	PBT-SNR [*]	5'-TAACCACTCCCAAACTATCTCTTA-	131441-131465	NC 000015

Tabla I. Cebadores utilizados para la amplificación de los loci H19 y SNRPN a Descritos por Kerjean et al., 2000

* Cebadores generados con el programa informático Pyro Q-CpG (QIAGEN)

** Cebadores generados con el programa informático MethPrimer

errores epigenéticos en amplias series de pacientes y en numerosos loci. Consisten en el tratamiento del DNA con bisulfito sódico, amplificación por PCR, clonaje y posterior secuenciación. Estas técnicas permiten realizar estudios cuantitativos de los niveles de metilación pero requieren un elevado tiempo para la obtención de resultados. Recientemente, se ha desarrollado una nueva tecnología, denominada pirosecuenciación, que permite optimizar la obtención de estos resultados cuantitativos (Tost and Gut, 2007), siendo la metodología de elección para nuestro estudio.

OBJETIVO

Determinar la incidencia de errores de metilación en regiones diferencialmente metiladas de los genes regulados por impronta genómica H19 (sub-banda 11p15.5) y SNRPN (región 15q11-q13) en espermatozoides de individuos que consultan por problemas de fertilidad mediante pirosecuenciación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras biológicas:
Individuos control:

Se analizaron 30 muestras control, 23 procedentes de donantes de semen de cariotipo normal y fertilidad probada. Las 7 restantes procedían de individuos de características seminales normales.

INDIVIDUOS INFÉRTILES:

Se analizaron 107 muestras de semen de individuos que consultaron por problemas de fertilidad:

15 normozoospermicos, 1 oligozoospermico, 8 astenozoospermicos, 30 teratozoospermicos, 1 oligoastenozoospermico, 5 oligoteratozoospermicos, 30 astenozoospermicos y 17 oligoastenoteratozoospermicos. Los individuos expresaron su voluntad de participar en el estudio mediante la firma del correspondiente consentimiento informado. Para garantizar la objetividad del análisis, el estudio se realizó a ciegas: no se conocía ni la etiología de los problemas de fertilidad ni tampoco las características del seminograma.

EXTRACCIÓN DE DNA ESPERMÁTICO:

La extracción de DNA espermático se realizó con el Kit de extracción PUREGEN® (QIAGEN) adaptando el protocolo a las concentraciones celulares de cada muestra.

TRATAMIENTO CON BISULFITO SÓDICO:

El bisulfito sódico convierte las citosinas no metiladas en uracilos bajo determinadas condiciones de pH y temperatura mediante una reacción de deaminación. Cuando el DNA modificado es amplificado por PCR, los residuos de citosina que se encuentran metilados se amplifican como citosinas y presentan guaninas como base complementaria. Las citosinas no metiladas convertidas en uracilos, se amplifican como timinas y presentan como base complementaria adeninas. En el análisis de la secuencia del producto de amplificación puede distinguirse las citosinas metiladas de las no metiladas en función de la presencia de citosinas y guaninas o adeninas y timinas.

DESCRIPCIÓN DE LOS LOCI DE LAS REGIONES 11P15.5 Y 15Q11-Q13:

En los cromosomas humanos 11 y 15 se encuentran dos de los dominios regulados por impronta genómica más estudiados debido a las implicaciones que presentan en el desarrollo del SBW, SSR, SPW o SA (Soejima and Wagstaff, 2005; Gicquel et al., 2005).

La sub-banda 11p15.5 contiene un segmento de aproximadamente 1 Mb donde se localizan diversos genes regulados por impronta genómica. El segmento se encuentra organizado en dos dominios regulados cada uno por su propio centro de regulación de la impronta (IC1 e IC2). El dominio 1, regulado por IC1, contiene el gen IGF2 y el gen H19. El promotor del gen H19 e IC1 se encuentran metilados en el

Locus	Cebador*	Secuencia	Nucleótidos	Nº Acceso GenBank
H19	PS1-H19F	5'-TCGGTTTTATCGTTTGGATG-	6133-6152	AF087017
	PS2-H19F	5'-TAGTGTAGGTTTATATATTA-	6200-6219	AF087017
SNRPN	PS3-H19F	5'-AACGTTTCGGGTTATTTAAG-	6257-6276	AF087017
	PS1-SNF	5'-AGGGAGGGAGTTGGGATT-	131216-131233	NC 000015
	PS3-SNF	5'-GAGTTTGGAGTAGAGTGGA-	131332-131350	NC 000015

Tabla II. Cebadores utilizados para la pirosecuenciación de los loci H19 y SNRPN

* Cebadores generados con el programa informático Pyro Q-CpG (QIAGEN)

cromosoma de origen paterno y no metilados en el cromosoma de origen materno. Errores en el establecimiento y/o mantenimiento de la metilación diferencial en este locus conlleva el desarrollo del SBW o del SSR. Para estudiar el patrón de metilación se analizaron 12 citosinas diferencialmente metiladas en un fragmento de 265 pb (nucleótidos 6064-6328, número de acceso al GenBank: AF087017) del IC1, que en el texto se nombrará locus H19 para facilitar su identificación.

El segmento cromosómico 15q11-q13 contiene un dominio de 4 Mb con diversos genes regulados por impronta genómica. El IC incluye la región promotora, el intrón 1 y el exón 1 del gen SNRPN y se encuentra metilado en el cromosoma materno y no metilado en el cromosoma paterno. Errores en el establecimiento y/o mantenimiento de la metilación diferencial en el cromosoma de origen materno conlleva el desarrollo del SA, mientras que errores en el cromosoma paterno conlleva el desarrollo del SPW. Para estudiar el patrón de metilación se analizaron 20 citosinas diferencialmente metiladas en un fragmento de 296 pb (nucleótidos 131166-131465, número de acceso al GenBank: NC 000015) del IC que incluye el exón 1 del gen SNRPN.

AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS LOCI H19 Y SNRPN:

El DNA tratado con bisulfito sódico se amplificó por PCR con cebadores diseñados para ser complementarios al DNA deaminado mediante dos rondas de amplificación.

Para generar el producto del locus H19, después de una primera ronda de amplificación con los cebadores H19F y H19R, se realizó una PCR semi-anidada con el cebador P-H19F y el cebador PBT-H19R marcado en el extremo 5' con biotina (Tabla I). La incorporación de un cebador biotinilado es necesaria para poder realizar la posterior pirosecuenciación. Las cantidades de reactivos utilizadas en la primera amplificación corresponden a 10mM de PCR buffer II, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.5 µM de cada uno de los cebadores y 1.25 U de AmpliTaq Gold DNA Polymerase. Las condiciones de

amplificación utilizadas corresponden a: Hot start de 94°C durante 10 minutos seguidos de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, annealing de 61°C durante 45 segundos, extensión a 72°C durante 1 minuto y 10 minutos de extensión final a 72°C. Los fragmentos obtenidos después de la primera ronda de amplificación presentan un tamaño de 322 pb y fueron recuperados de gel de agarosa al 2% con el Kit Qiaquick gel extraction (QIAGEN) antes de realizar la PCR semi-anidada. Las cantidades de reactivos utilizadas en la segunda ronda de amplificación corresponden a 10mM de PCR buffer II, 2 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTPs, 0.5 µM de cada uno de los cebadores y 2 U de AmpliTaq Gold DNA Polymerase. Las condiciones de amplificación utilizadas corresponden a: Hot start de 95°C durante 15 minutos, seguidos de 50 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, annealing de 61°C durante 30 segundos, y extensión a 72°C durante 10 segundos. Los fragmentos obtenidos después de la PCR semi-anidada presentan un tamaño de 265 pb.

Para generar el producto del locus SNRPN, después de una primera ronda de amplificación con los cebadores SNRPNF y SNRPNR, se realizó una PCR anidada con el cebador P-SNF y el cebador PBT-SNR marcado en el extremo 5' con biotina (Tabla I). Las cantidades de reactivos utilizadas en la primera amplificación corresponden a 10mM de PCR buffer II, 2 mM MgCl₂, 0.8 mM dNTPs, 1 µM de cada uno de los cebadores y 1.25 U de AmpliTaq Gold DNA Polymerase. Las condiciones de amplificación utilizadas corresponden a: Hot start de 94°C durante 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, annealing de 53°C durante 45 segundos, extensión a 72°C durante 45 segundos y 10 minutos de extensión final a 72°C. Los fragmentos obtenidos después de la primera ronda de amplificación presentan un tamaño de 400 pb y fueron recuperados a partir de gel de agarosa al 2% con el Kit Qiaquick gel extraction (QIAGEN) antes de realizar la PCR anidada. Las cantidades de reactivos utilizados en la segunda ronda de amplificación corresponden a 10mM de PCR buffer II, 2 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTPs, 0.5 µM de cada uno de los

cebadores y 2 U de AmpliTaq Gold DNA Polymerase. Las condiciones de amplificación utilizadas corresponden a: Hot start de 95°C durante 15 minutos, seguidos de 50 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, annealing de 63°C durante 30 segundos, y extensión a 72°C durante 10 segundos. Los fragmentos obtenidos después de la PCR anidada presentan un tamaño de 296 pb.

Las reacciones de amplificación tanto para H19 como para SNRPN se han realizado en un volumen final de 25 µl en un termociclador Eppendorf Mastercycler gradient (Eppendorf). Los productos de amplificación se visualizaron en un gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio.

PIROSECUENCIACIÓN:

La incorporación de un cebador marcado en el extremo 5' con biotina en la segunda ronda de amplificación tanto del locus H19 como SNRPN permite la recuperación de cadenas sencillas de DNA (a través de la unión entre la biotina y sefarosa-estreptavidina) para la realización de la pirosecuenciación. La recuperación de cadenas sencillas se ha realizado mediante la utilización del Vacuum Preparation Tool (QIAGEN).

La reacción de pirosecuenciación se ha realizado con el PyroGold SQA reagent kit (QIAGEN) según el protocolo comercial. La secuencia de los loci H19 y SNRPN se han obtenido con los cebadores especificados en la Tabla II. La obtención de los resultados se ha realizado en un pirosecuenciador PyroMark Q96 MD (QIAGEN).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El gen H19 presenta metilación en el alelo paterno. Las citosinas metiladas de este locus no han sido modificadas por el tratamiento con bisulfito sódico y se considera que la impronta correcta consiste en observar citosinas en su secuencia. Por contra, el gen SNRPN presenta metilación en el alelo materno. Así pues, las citosinas en este locus han sido modificadas con el tratamiento de bisulfito sódico y se considera correcta la presencia de timinas en su secuencia.

EVOLUCIÓN PREMIOS ASEBIR-EMB 2007

Marta Pladevall et al, Incidencia de anomalías epigenéticas de los loci H19 y SNRPN

Se han clasificado como anomalías totales aquellas que afectan a la totalidad de las CpG analizadas y como anomalías puntuales a las que sólo afectan a determinadas CpG dentro de la región analizada.

En la tabla III se muestran los resultados obtenidos para el locus H19. En todos los individuos controles analizados y en 54 individuos infértiles se detectó el patrón de metilación esperado para el locus H19. De la población de individuos infértiles,

35 presentaron anomalías puntuales y 18 anomalías totales en este locus.

En la tabla IV se muestran los resultados obtenidos para el locus SNRPN. Se obtuvo el patrón de metilación esperado en todos los individuos controles y en 96 individuos infértiles. Se detectaron anomalías puntuales en 11 individuos infértiles, de los cuales, 6 también presentaban anomalías en H19 (1 anomalía total y 5 anomalías puntuales).

Se han correlacionado las anomalías de los loci H19 y SNRPN con las características del seminograma de los pacientes (Tabla V). Se han encontrado anomalías relacionadas con todos los parámetros seminales, siendo mayoritarias en los individuos que presentan el componente oligo y terato. Existen trabajos previos, en los que se han relacionado errores en la impronta genómica con recuentos espermáticos bajos (Marques et al., 2004; 2008; 2009; Kobayashi et al., 2007). Nuestros resultados avalan de forma consistente la relación entre problemas de fertilidad y anomalías en la impronta genómica, dado que todas las anomalías están presentes únicamente en la población infértil. A pesar de que en los estudios previos de la literatura las anomalías en la impronta se habían relacionado únicamente con el componente oligo, nuestros resultados correlacionan tanto con el componente oligo como con el terato, siendo mayoritarias en aquellos individuos que presentan ambos componentes (Tabla V).

		H19 (12CpG)												T
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Controles n=30	Patrón esperado	██												30
	Patrón anómalo	██												54
Infértiles n=107	Anomalías puntuales	██	1											
		██	1											
		██	1											
		██	4											
		██	2											
		██	2											
		██	1											
		██	6											
		██	1											
		██	1											
		██	1											
		██	1											
		██	1											
		██	1											
		██	1											
		██	1											
		Anomalías totales	██	18										

Tabla III. Resultados del locus H19 relacionados con el número de individuos que lo presentan. Cada fila representa un patrón de metilación y el número de individuos que lo presentan. Patrón de metilación esperado, Patrón anómalo.

		SNRPN (20CpG)																				T
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Controles n=30	Patrón esperado	██																				30
	Patrón anómalo	██																				96
Infértiles n=107	Anomalías puntuales	██	1																			
		██	1																			
		██	1																			
		██	1																			
		██	1																			
		██	1																			
		██	1																			
		██	1																			
		██	1																			
		██	1																			
		██	1																			
Anomalías totales	██	11																				

Tabla VI. Resultados del locus SNRPN relacionados con el número de pacientes que lo presentan. Cada fila representa un patrón de metilación y el número de individuos que lo presentan. Patrón de metilación esperado, Patrón anómalo.

	N (n=15)	A (n=8)	T (n=30)	O (n=1)	OA (n=1)	OT (n=5)	AT (n=30)	OAT (n=17)
H19	5	1	14	1		4	11	11
SNRPN		1	1				2	1
H19+SNRPN	1				1		2	2
Total	6/15 (40%)	2/8 (25%)	15/30 (50%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)	4/5 (80%)	15/30 (50%)	14/17 (82%)

Tabla V. Correlación entre anomalías en los loci H19, SNRPN, y presentes en ambos loci y el seminograma de los individuos infértiles. N: Normozoospermicos, A: Astenozoospermicos, T: Teratozoospermicos, O: Oligozoospermicos, OA: Oligoteratozoospermicos, OT: Oligoteratozoospermicos, AT: Astenoteratozoospermicos, OAT: Oligoastenozoospermicos.

Nuestra aproximación experimental nos permite estudiar un amplio número de individuos y de genes con el objetivo de completar nuestros resultados y ver si la relación entre errores epigenéticos y infertilidad se cumple también para otros genes regulados por impronta genómica.

AGRADECIMIENTOS:

Dr. Mark Grossmann y Ma Carme Pons (URA, Centro Médico Teknon). Dr. Nicolás Garrido (IVI- Valencia). Proyecto EME2005-38 y beca UAB2006-00213 (Universitat Autònoma de Barcelona).

BIBLIOGRAFÍA:

Borghol N, Lornage J, Blachere T, Sophie Garret A, Lefevre A. Epigenetic status of the H19 locus in human oocytes following in vitro maturation. *Genomics* 2006; 87: 417-426.

Cox GF, Bürger J, Lip V, Ulrike AM, Seprling D, Wu B, Horsthemke B. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 162-164.

DeBaun MR, Niemitz EL, McNeil DE, Brandenburg SA, Lee MP, Feinberg AP. Epigenetic alterations of H19 and LIT1 distinguish patients with Beckwith-Wiedemann syndrome with cancer and birth defects. *Am J Hum Genet* 2002; 70(3):604-11.

El-Maarri O, Buiting K, Peery EG, Kroisel PM, Balaban B, Wagner K, et al. Maternal methylation imprints of human chromosome 15 are established during or after fertilization. *Nat Genet* 2001; 27: 341-344.

Geuns E, De Rycke M, Van Steirteghem A, Liebaers I. Methylation imprints of the imprint control region of the SNRPN-gene in human gametes and preimplantation embryos. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 2873-2879.

Gicquel C, Rossignol S, Cabrol S, Houang M, Steunou V, Barbu V, et al. Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. *Nat Genet* 2005; 37: 1003-7.

Halliday J, Oke K, Breheny S, Algar E, J Amor D. Beckwith-Wiedemann syndrome and IVF: a case-control study. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 526-528.

Kerjean A, Dupont JM, Vasseur C, Le Tessier D, Cuisset L, Paldi A, et al. Establishment of the paternal methylation imprint of the human H19 and MEST/PEG1 genes during spermatogenesis. *Hum Molec Genet* 2000; 9: 2183-2187.

Khosla S, Dean W, Brown D, Reik W, Feil R. Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. *Biol Reprod* 2001; 64: 918-926.

Kobayashi H, Sato A, Otsu E, Hiura H, Tomatsu C, Utsunomiya T, et al. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Hum Mol Genet* 2007; 16(21):2542-51.

Laprise SL. Implications of epigenetics and genomic imprinting in assisted reproductive technologies. *Mol Reprod Dev* 2009.

Lawrence LT and Moley KH. Epigenetics and assisted reproductive technologies: human imprinting syndromes. *Semin Reprod Med* 2008; 26(2):143-52.

Li T, Vu TH, Ulaner GA, Littman E, Ling JQ, Chen HL, et al. IVF results in de novo DNA methylation and histone methylation at an Igf2-H19 imprinting epigenetic switch. *Mol Hum Reprod* 2005; 11(9):631-40.

Ludwig M, Katalinic A, Gross S, Sutcliffe A, Varon R, Horsthemke B. Increased prevalence of imprinting defects in patients

with Angelman syndrome born to subfertile couples. *J Med Genet* 2005; 42: 289-291. Mann MR, Lee SS, Doherty AS, Verona RI, Nolen LD, Schultz RM, Bartolomei MS. Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation development in culture. *Development* 2004; 131(15):3727-35.

Manning M, Lissens W, Liebaers I, Van Steirteghem A, Weidner W. Imprinting analysis in spermatozoa prepared for intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Int J Androl* 2001; 24(2):87-94.

Marques CJ, Carvalho F, Sousa M, Barros A. Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *The Lancet* 2004; 363: 1700-1702.

Marques CJ, Costa P, Vaz B, Carvalho F, Fernandes S, Barros A, Sousa M. Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Mol Hum Reprod* 2008; 14(2):67-74.

Marques CJ, Francisco T, Sousa S, Carvalho F, Barros A, Sousa M. Methylation defects of imprinted genes in human testicular spermatozoa. *Fertil Steril* 2009.

Murphy SK and Jirtle RL. Imprinting evolution and the price of silence. *Bioessays* 2003; 25(6):577-88.

Niemitz EL, Feinberg AP. Epigenetics and assisted reproductive technology: a call for investigation. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 599-609.

Orstavik KH, Eiklid K, van der Hagen CB, Spetalen S, Kierulf K, Skjeldal O, Buiting K. Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 218-219.

Soejima H and Wagstaff J: Imprinting centers, chromatin structure, and disease. *J Cell Biochem* 2005; 95: 226-33.

Tost J and Gut IG. *Nat Protoc* 2007; 2(9): 2265-2275.

VITRIFICACIÓN Y HATCHING ASISTIDO

Empar Ferrer, Minerva Ferrer, Carmen Calatayud, Miguel Ruiz Jorro y Maria Vila.

CREA (Centro Médico de Reproducción Asistida) – VALENCIA.

empar.ferrer@creavalencia.com.

INTRODUCCIÓN

La crioconservación es hoy en día una práctica necesaria en los laboratorios de embriología clínica, tanto como método para almacenar los embriones sobrantes, como para la prevención del Síndrome de Hiperestimulación Ovárica, ayuda en las estrategias terapéuticas en los casos de alteración de la receptividad endometrial o para preservar la fertilidad de determinadas pacientes. La calidad asistencial de un centro de reproducción asistida dependerá, en gran parte, del éxito de su programa de crioconservación, que permitirá mejorar, no solo la efectividad de los tratamientos al aumentar la tasa acumulada de gestación, sino también su seguridad y simplicidad, de manera que el método utilizado debe ser tenido muy en cuenta al incorporarlo al Sistema Integral de Calidad del laboratorio de embriología. En la presente revisión hacemos un repaso de nuestra

líquido. Esta se ha considerado una técnica segura, debido a que los cambios osmóticos no producen deformaciones extremas en las células y la concentración de crioprotectores no causa daños tóxicos severos. No obstante, estas bajas concentraciones pueden ser insuficientes para evitar la formación de cristales dentro de la célula. Existe un límite muy pequeño entre el porcentaje de pérdida de agua de la célula y la formación de cristales extracelulares, porque una excesiva deshidratación podría conducir a niveles de crioprotector intracelular tóxicos. Aunque este procedimiento de congelación lenta sigue siendo hoy en día el método más utilizado de crioconservación, cada vez son más numerosos los centros que escogen la vitricación como método para crioconservar los embriones, animados, entre otras cosas, por los resultados publicados comparando ambas técnicas (Tabla I).

solidifican y pasan a un estado vítreo. Para que esto pueda ocurrir, se deben utilizar altas concentraciones de crioprotectores, aumentar de la velocidad de enfriamiento (15000°C-30000°C/min) y disminuir el volumen de la solución de vitricación.

En los últimos años, se han descrito diferentes protocolos de vitricación para ovocitos, embriones en estadio de división y blastocistos, con diferentes combinaciones de crioprotectores (Dimetilsulfóxido, Propanodiol, Glicerol, Etilenglicol...) y nuevos sistemas de soporte, ya sean "abiertos" (Grills, Open pulls straws, Cryoloop, Cryotop...), o "cerrados" (Hemi-straws, Cryotip...). Existe una amplia bibliografía donde se evalúa su eficacia clínica frente a la congelación lenta. Aunque existen algunos resultados contradictorios, parece evidente que la vitricación consigue un aumento en la tasa de supervivencia embrionaria y mejora las

Tabla I: Publicaciones que comparan congelación lenta vs vitricación

Autores	Año	Tipo de estudio	Crioprotector. Soporte	Estadio
Kulesova LL	2002	Revisión	-----	-----
Stehlik E	2005	Retrospectivo	EG+DMSO. Cryotop	D+5 y D+6
Vatja G	2006	Revisión	-----	-----
Liebermann J	2006	Retrospectivo	EG+DMSO. Cryotop.	D+5 y D+6
Balaban B	2008	Randomizado	EG+PROH	D+3
Loutradi KE	2008	Revisión. Meta-análisis	-----	-----
Valojerdi MR	2009	Retrospectivo	EG+DMSO. Cryotop.	D+3

experiencia con la vitricación embrionaria y el Hatching Asistido.

En 1983, Trounson y Mohr describieron la primera gestación en humanos con embriones congelados. Posteriores modificaciones de la técnica añadieron 1,2-propanodiol (PrOH) y sacarosa como crioprotectores, y un proceso de congelación lenta hasta -30°C antes de la inmersión directa en nitrógeno

La primera publicación sobre esta técnica fue presentada en 1985 por Rall and Fahy en roedores, definiendo la vitricación como: "La solidificación de una solución acuosa a una baja temperatura sin la formación de cristales de hielo debido a un aumento de su viscosidad". La vitricación, evita la formación de cristales de hielo tanto en el medio intracelular como en el extracelular que directamente se

tasa de gestación e implantación. Por otra parte los primeros estudios neonatales con niños nacidos de estas técnicas avalan por el momento la seguridad del proceso ya que los resultados son similares a los encontrados cuando se realizan los ciclos en fresco (Takahashi et al., 2005; Rama Rayu et al., 2008). Además la vitricación ofrece otras ventajas prácticas relacionadas no solo con la

eficacia de la técnica, sino también con su sencillez y su seguridad, como son el hecho de no depender de un instrumental específico y caro, la rapidez del proceso o el tiempo limitado que los embriones permanecen fuera del incubador. Por todo ello, cada vez son más los centros que consideran la vitrificación como el mejor método para la crioconservación de embriones.

En nuestro centro, tras un periodo inicial de práctica para conseguir la suficiente destreza y seguridad en todo el proceso, primero con embriones de ratón y después con embriones humanos no viables, decidimos dejar de utilizar la congelación lenta de forma definitiva, a tenor de los buenos resultados obtenidos ya en embriones humanos viables, en Noviembre de 2005, siendo desde entonces nuestro único método de crioconservación embrionaria. En el año 2007, presentamos nuestros resultados tras dos años de experiencia (Ferrer et al, 2007), demostrando la efectividad de la técnica, con una tasa de supervivencia a la vitrificación del 96,4%, una tasa de gestación del 51,8% y una tasa de implantación del 34,1% en 84 ciclos de transferencia de embriones desvitrificados en D+3. Después de estos alentadores resultados, hemos ido valorando diferentes modificaciones de la técnica con el fin de intentar mejorar las tasas de implantación embrionaria. Uno de los procedimientos que nos planteamos fue hacer Hatching Asistido a los embriones desvitrificados.

HATCHING EN EMBRIONES VITRIFICADOS

En el proceso natural de Hatching in vivo, la zona pelúcida (ZP) se va adelgazando y reblandeciendo, debido a la lisis producida por enzimas secretadas por el embrión y a la presión hidrostática ejercida por la expansión del blastocisto. Algunos embriones presentan una zona uniforme, mientras que otros presentan secciones más delgadas que podrían favorecer la expansión del blastocisto y el hatching (Cohen 1988). La media del grosor de la zona pelúcida (ZPT) y sobre todo, la asincronía o variación en su grosor (ZPTV), son índices que informan de las características de la ZP y de las posibilidades de eclosión del embrión. Durante el proceso de crioconservación de embriones se ha descrito un posible endurecimiento de la zona pelúcida, lo que podría conducir a un fallo en su rotura e impedir la eclosión y por tanto, la implantación (Van den Abbeel et al., 2000; Moreira Da Silva et al., 2005; Hiraoka et al., 2008).

El Hatching Asistido (HA) está definido como una rotura artificial en la ZP, y se introdujo en el laboratorio de fecundación in vitro por Malter y Cohen en 1989 como un método para facilitar el hatching y mejorar los porcentajes de gestación. Desde entonces se han desarrollado diferentes técnicas para a "agujerear" o adelgazar la zona pelúcida tales como la disección parcial de la zona (PZD y PZD-3), el uso de soluciones ácidas, proteinasas, vibradores piezo eléctricos o Láser. Desde sus primeras aplicaciones se han realizado numerosos trabajos para valorar en qué grado afectan estos procesos a la viabilidad del embrión y todavía existe

hoy una gran controversia acerca de su utilidad clínica. Mientras que algunos estudios demuestran indicios de que mejora las tasas de implantación y de gestación, especialmente en mujeres con mal pronóstico, con edad avanzada, fallos repetidos de implantación, malas calidades embrionarias o en embriones congelados (Gabrielsen et al., 2004), en otros no se demostró ningún beneficio significativo (Ng EH et al., 2005). Esta disparidad en los resultados puede justificarse por la diferencia en los diseños experimentales, en los criterios de selección, al tamaño de la muestra o la diferente técnica de Hatching utilizada. Estudios de metanálisis y revisiones Cochrane realizados concluyen que los trabajos publicados son insuficientes para poder aconsejar el uso clínico del Hatching Asistido, aunque en ciertos perfiles de pacientes, con peor pronóstico de embarazo, sí podría aportar un beneficio, como en el caso concreto de la transferencia de embriones congelados (Sallam et al., 2003; Edi-Osagie et al., 2003; Seif et al, 2006). Efectivamente, la mayoría de los estudios prospectivos observan alguna mejora en los resultados clínicos al realizar Hatching Asistido en embriones congelados (Tabla II). Existen, sin embargo, muy pocas publicaciones que valoren su eficacia en embriones vitrificados, los cuales podrían comportarse de forma diferente, en este aspecto, a los embriones congelados; se ha observado que en ovocitos, la congelación lenta afecta más a la zona pelúcida que la Vitrificación, y esto podría ocurrir también a nivel embrionario (Ko, 2008).

Ante estos hechos, nos marcamos como objetivo valorar la efectividad del

Tabla II: Selección de referencias relacionadas con el Hatching Asistido en embriones congelados y vitrificados. (TG = Tasa de Gestación TI = Tasa de Implantación)

Autor	Año	Técnica AH	Estadio	Estudio	Resultados
Cohen J	1988	-----	PN y D+3	Valoración ZP y ZPTV	-----
Check JH	1996	Ac. Tirole-opening	D+3	Estudio retrospectivo	↑ TG
Vanderzwlamen P	2003	PZD-3. Vitrificados-HS	D+5	Estudio retrospectivo	↑ TG ↑ TI
Gabrielcsen A	2004	Ac. Tirole-opening	D+2	Estudio prospectivo randomizado	- TG ↑ TI
Ng EHY	2005	Láser thinning	D+2	Estudio prospectivo	- TG - TI
Sifer C	2006	Pronasa thinning	D+2 y D+3	Estudio prospectivo	- TG - TI
Balaban B	2006	Láser	D+3	Estudio prospectivo randomizado	↑ TG ↑ TI
Valojerdi MR	2008	Láser opening	D+2	Estudio prospectivo randomizado	↑ TG ↑ TI
Hiraoka K	2008	Láser . a) 40µm b) 50% eliminado	D+2 y D+3, All D+5	Estudio retrospectivo	↑ TG ↑ TI ↑ OR
Ge HS	2008	Láser thinning: 25% y 50 % ZP	D+2 y D+3	Estudio prospectivo randomizado	↑ TG ↑ TI ↑ OR

Hatching Asistido en embriones vitrificados. Para poder estimar la eficacia real de la técnica, cuantificamos, en primer lugar y de forma retrospectiva, la pérdida de viabilidad de los embriones de buena calidad tras su vitrificación y desvitrificación, en tres grupos diferentes de pacientes: (i) Grupo de Buen Pronóstico (BP) que incluye pacientes jóvenes (menos de 37 años de edad) y receptoras de ovocitos. (ii) Grupo de pacientes con Fallo de Implantación (FI) que incluye mujeres jóvenes con al menos dos ciclos previos fallidos de FIV/ICSI. (iii) Grupo de Edad Avanzada (EA) que incluye mujeres con 37 ó más años de edad. Una vez conocida la pérdida de potencial implantatorio debido a la vitrificación, nos planteamos analizar, en segundo lugar y de forma prospectiva y randomizada, los posibles beneficios clínicos obtenidos tras el uso del Hatching Asistido en embriones desvitrificados, comparando los resultados obtenidos en cada grupo de pacientes, según el grosor de la zona pelúcida y dependiendo del grado de reactivación de la mitosis en los embriones desvitrificados, con el fin de encontrar aquellos grupos o indicadores en los cuales el HA podría ser más beneficioso.

MATERIAL Y MÉTODO

SELECCIÓN DE PACIENTES

Para valorar la tasa implantación de los embriones, en fresco y tras su vitrificación, se seleccionaron de nuestra base de datos, de forma retrospectiva, aquellas pacientes con más de 2 embriones de buena calidad en las que se vitrificó algún embrión el mismo día de la transferencia y se calculó la tasa de implantación de dichos embriones en el ciclo en fresco y en el ciclo de vitrificados, si lo hubo, clasificando los resultados para cada grupo de estudio. Para valorar la eficacia del HA se diseñó un estudio prospectivo randomizado que continúa en marcha y que por el momento incluye 88 ciclos de transferencias de embriones vitrificados en día +3 (46 con hatching asistido y 42 sin hatching asistido). Se realizaron tres tablas de asignación randomizada para cada uno de los perfiles de pacientes estudiados: Buen Pronóstico (BP), Fallo

de Implantación (FI) y Edad Avanzada (EA).

CULTIVO EMBRIONARIO. PROCEDIMIENTO DE VITRIFICACIÓN Y DESVITRIFICACIÓN

Tras la aspiración e inseminación o microinyección de los ovocitos, los embriones han sido cultivados en medios secuenciales (Vitrolife G5 Series). En D+3 se clasificaron siguiendo los criterios de ASEBIR y se realizó la transferencia embrionaria y la vitrificación de los embriones sobrantes de calidad A ó B. Los embriones no vitrificados este día, se han mantenido en cultivo, vitrificándose aquellos que alcanzaron el estadio de blastocisto. Para el proceso de vitrificación utilizamos el sistema Vit Kit (Irvine Scientific) con DMSO y Etilenglicol (EG) como crioprotectores permeables, siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial. El soporte utilizado ha sido las Hemistraws, HSV kit: High Security Vitrification Kit (CBS Systems).

Para la desvitrificación de las pajuelas HSV, las sumergimos directamente en un baño de agua a 30° C durante 3 segundos, inmediatamente tras extraerlas del nitrógeno líquido. Los medios utilizados son el Thaw Kit (Irvine Scientific) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Una vez terminado el proceso de desvitrificación, los embriones se cultivan hasta el día siguiente en gotas de medio G-2 (Vitrolife G5 Series), suplementadas con albúmina (HSA) hasta una concentración final de 12mg/ml, igual a la que presentan los medios de vitrificación.

CÁLCULO DE ZPTV Y ZPT

Una vez desvitrificados y antes de realizarles el HA, se captura una imagen a 400 aumentos de cada uno de los embriones. Para el análisis de las imágenes utilizamos el programa USI-OVO (PROISER), obteniéndose cinco medidas de la ZP: a las 12, 4 y 8 horarias, el valor máximo y el mínimo (fig.1). Los valores de la variación del grosor de la zona pelúcida (ZPTV) y la media (ZPT) se han calculado a partir de la siguiente fórmula:

ZPmed: La media de los 5 valores, a las 12, 4 y 8, el valor máximo y el mínimo.

ZPTV: Cálculo del porcentaje de variación de la ZP:

$$ZPTV: \frac{ZP_{\text{máx}} - ZP_{\text{med}}}{ZP_{\text{med}}} * 100$$

PROCEDIMIENTO DEL HATCHING ASISTIDO (HA)

El día de la desvitrificación, tras 2 horas de cultivo, llevamos a cabo el HA de cada embrión. En gotas independientes de G-MOPS PLUS (Vitrolife G5 Series), se realiza con solución ácida Tyrode (Medi-Cult) un orificio aproximado de 30 µm en la ZP, a las tres horarias (fig.2). Los embriones se cultivan hasta el día siguiente en gotas de G-2 (Vitrolife G5 Series) suplementadas con una concentración final de 12 mg/ml de HSA.

EVALUACIÓN ESTADÍSTICA

Las gestaciones clínicas se han definido por la presencia de uno o más sacos gestacionales. La tasa de implantación se ha calculado a partir de la proporción de embriones transferidos que presentaron un saco gestacional. Los resultados se analizaron utilizando la t-student o test ANOVA para las variables numéricas y el test Chi-cuadrado para las categóricas.

RESULTADOS

Tasa de implantación en embriones de buena calidad transferidos "en fresco" o post-vitrificación.

Hasta hoy, se han incluido, para el análisis retrospectivo, 349 transferencias en día D+3 de embriones en fresco de buena calidad (clasificación A-B según los criterios ASEBIR), procedentes de ciclos de FIV, ICSI o donación de óvulos en fresco, en las que además se realizó vitrificación de embriones el mismo día. Se han vitrificado un total de 975 embriones, de los cuales se han desvitrificado, hasta la fecha, 572 y se han transferido 406 en 224 ciclos de criotransferencia, ya sea de embriones propios o de embriodonación. No se ha realizado HA en 171 de los 224 ciclos de criotransferencia y de ellos 143 han sido incluidos para el cálculo de la pérdida de

potencial implantatorio en embriones de buena calidad tras ser vitrificados, al haberse descartado los casos con transferencias mixtas (embriones con diferente grado de reanudación mitótica) (Tabla III).

Uno de los resultados más importantes encontrados es la alta correlación entre el grado de Reanudación de la Mitosis (RM) tras 20 horas de cultivo postdesvitrificación y la tasa de gestación e implantación embrionaria

todavía mas patente cuando los ciclos de criotransferencia se categorizan en intervalos más concretos, como se describe en la Tabla IV.

Tabla III: Tasa de gestación e implantación de los embriones antes y después de vitrificarse en función del grado de reanudación de la mitosis. (BP: Buen Pronóstico FI: Fallo Implantación EA: Edad Avanzada: > 37 años) (Reanudación de la mitosis: “-“: entre 0 y 2 blastómeras divididas tras 20 h de cultivo post desvitrificación; “+“: Más de 2 blastómeras divididas o signos de compactación tras 20 h de cultivo post desvitrificación).

	Transferencias en Fresco			Ciclo embriones desvitrificados (sin AH)					
	BP	FI	EA	BP	+	-	+	-	+
Reanudación de la Mitosis (RM)				-	+	-	+	-	+
Nº Ciclos con Transferencia	250	45	54	39	55	5	17	12	15
Nº Emb. Vitrificados o Desvitrf.	726	114	135	108	144	11	51	30	44
Embs. Transferidos (Media ±ES)	482 1,93 ±0,27	90 2,0 ±0,62	106 1,84 ±0,75	67 1,71 ±0,10	101 1,83 ±0,07	8 1,60 ±0,24	34 2,00 ±0,09	21 1,75 ±0,13	26 1,73 ±0,12
Gestación Clínica (%)	161 (64,4) ^{a,A}	25 (55,6) ^b	21 (38,9) ^{a,b}	13 (33,3) ^{a,c}	34 (61,8) ^c	0 (0)	9 (52,9)	1 (8,3)	7 (46,6)
Implantación (%)	221 (45,8) ^{d,D}	34 (36) ^d	25 (23,5) ^d	14 (20,9) ^b	40 (39,6)	0 (0)	10 (29,4)	1 (4,7)	7 (26,9)
Gestación Clínica Global (%)		207 (59,3) ^c				63 (44,0) ^c			
Implantación Global (%)		280 (41,2) ^D				75 (29,2) ^D			
Implantación si RM +						57 (35,4) ^c			
Implantación si RM -						15 (15,6) ^c			

Valores con igual índice alfabético en diferente columna difieren estadísticamente (p<0,05). Caracteres en minúscula comparan valores intragrupo y caracteres en mayúscula comparan valores entre los grupos.

Cuando el número de embriones desvitrificados viables ha sido superior al número de embriones a transferir, los no transferidos se han mantenido en cultivo, revitrificándose aquellos que alcanzan el estadio de blastocisto. La revitrificación es también una técnica útil en el laboratorio de embriología y cuya efectividad ya hemos confirmado con anterioridad (Ferrer et al, 2007). En 7 pacientes no hubo transferencia, al no superar el proceso de desvitrificación ninguno de los embriones.

para todos los perfiles de pacientes estudiados (Tabla III). La tasa de implantación de un embrión vitrificado tras sobrevivir a la desvitrificación (<50% células degeneradas) puede disminuir del orden de un 6% si tras 20h cultivo se ha observado división en más de 2 de sus blastómeros o presenta indicios de compactación, o hasta un 26% si el número de blastómeros divididos ha sido menor. El fuerte valor predictivo del número de blastómeros divididos tras 20 h post cultivo es

HATCHING ASISTIDO EN EMBRIONES DESVITRIFICADOS

Se han desvitrificado un total de 192 embriones, correspondientes a 88 ciclos de criotransferencia y de forma prospectiva y randomizada, se ha realizado Hatching Asistido en 46 de los ciclos, antes de la transferencia.

No existen diferencias entre los grupos HA y el control en cuanto a la media de embriones transferidos (1,91 ± 0,05 vs

Tabla IV. Correlación de la Tasa Implantación con el grado de RM tras 20 h post desvitrificación de los embriones transferidos

Reanudación mitosis (todos los emb. transferidos)	Ciclos de Embriones Desvitrificados				p-valor
	Compactando	>2 blast. divididas	≤ 2 blast. divididas	0 blast. divididas	
Nº ciclos	53	17	21	16	
Nº embs. con reanudación correcta de mitosis (%)	69 (66,9)	23 (71,8)	21 (75,0)	19 (82,6)	NS
Tasa implantación (%)	37/103 (35,9)	8/32 (25,0)	4/28 (14,3)	1/23 (4,3)	< 0.001

1,97 ± 0,02) o el porcentaje de embriones con una adecuada reanudación de la mitosis (53,4 vs 57,8%). Las tasas de gestación clínica comparadas entre el grupo de Hatching Asistido y el grupo control, no son estadísticamente significativas (41,3 vs 45,2 %), ni tampoco las tasas de implantación (27,3 vs 31,3 %).

CORRELACIÓN DE ZPTV Y HA CON LA TASA DE IMPLANTACIÓN

Basándonos en el valor medio de ZPTV se realizaron dos grupos: ZPTV mayor o igual al 20% y ZPTV menor del 20%. Dado el reducido tamaño muestral con el que por el momento cuenta el estudio, no es posible realizar un análisis por grupos de pacientes (BP, FI, EA), por lo que se muestran todos los datos agrupados. Para el análisis de los datos no se han tenido en cuenta las transferencias mixtas (embriones con ZPTV mayor y menor del 20%). En la Tabla V se observa que los porcentajes de

análisis de los datos por subgrupos (Tabla VI) indica que las tasas de gestación clínica e implantación no mejoran de forma significativa cuando se realiza HA en ninguno de los dos grupos.

DISCUSIÓN

La aplicación de la vitricación como técnica de crioconservación, nos aporta unos resultados de supervivencia, tasas de implantación y gestación, superiores a los que obteníamos con la congelación lenta; sin embargo, si esto es así y conseguimos tener las mismas calidades embrionarias en fresco que en vitricados, ¿por qué continúan siendo más bajos los porcentajes de gestación en transferencias de embriones vitricados comparados con los ciclos de embriones en fresco?

Durante la vitricación (como en la congelación), los embriones están expuestos a un notable stress mecánico,

y la tasa de gestación clínica, un 16.1%. Esta disminución en el potencial implantatorio del embrión, viene determinada, especialmente, por el grado de Reanudación de la Mitosis (RM) tras 20 horas de cultivo post-desvitricación y en concreto, por el número de blastómeras divididas en ese periodo de tiempo. Así, la tasa de implantación de los embriones con menos de 2 blastómeras divididas fue un 21% menor que la observada en el grupo de pacientes donde alguno de los embriones transferido tuvo una división apropiada (definido como aquel en el que se observaron más de dos blastómeras divididas o signos de compactación tras 20 h post-desvitricación). Existe una relación lineal significativa entre ambas variables de forma que hay un incremento aproximado de un 10% en el potencial de implantación a medida que aumenta el número de divisiones celulares post desvitricación. Esta relación entre capacidad de reanudar la

Tabla V: Eficacia Clínica del Hatching Asistido según ZPTV

	Control			Hatching Asistido		
	ZPTV ≥ 20	ZPTV < 20	p-valor	ZPTV ≥ 20	ZPTV < 20	p-valor
Ciclos de Transferencia	21	15		28	14	
Embs. Transferidos (Media ±S)	1,95 ±0,05	1,87 ±0,09	NS	1,89 ±0,06	1,93 ±0,07	NS
Nº embs. con reanudación correcta de mitosis (%)	24 (58,5)	18 (64,2)	NS	35 (66,0)	16 (55,5)	NS
Gestación Clínica (%)	10 (47,6)	5 (33,3)	NS	12 (39,2)	4 (28,6)	NS
Implantación (%)	15 (36,5)	7 (25,0)	NS	17 (32,0)	7 (25,9)	NS
Implantación Global (%)	23 (33,3)			23 (28,7)		NS

gestación clínica y de implantación embrionaria son mayores en el grupo de ZPTV >20%, tanto en el grupo con HA como en el control, pero no se llega a observar significancia estadística. Tampoco se ha encontrado una mejora significativa al realizar HA en el grupo de peor pronóstico con ZPTV<20%.

CORRELACIÓN DE ZPT Y HA CON LA TASA DE IMPLANTACIÓN

Basándonos en el valor medio de ZPT, se han realizado dos grupos: ZPT mayor o igual a 15µm y ZPT menor de 15µm. El

químico y térmico que podría comprometer el desarrollo celular. Algunos marcadores están relacionados con la viabilidad de los embriones vitricados, como la supervivencia de las blastómeras o la reanudación de la mitosis tras su desvitricación. Varios estudios han demostrado que la reanudación de la mitosis aumenta significativamente las tasas de implantación (Ziebe et al., 1998). Según nuestros resultados, la capacidad implantatoria de los embriones desvitricados disminuye una media de un 12% respecto a los embriones frescos

mitosis y el potencial implantatorio del embrión desvitricado es tan evidente y sus consecuencias tan importantes que consideramos que la valoración del porcentaje de embriones desvitricados que reanudan correctamente la mitosis podría ser un excelente indicador de calidad de un laboratorio de embriología clínica.

Por otra parte, incluso los embriones con mejor RM tras la desvitricación, tienen un menor potencial de implantación (5,3%) que los embriones frescos. Para explicar esta diferencia en

Tabla VI: Eficacia Clínica del Hatching Asistido según ZPT

Ciclos de Transferencia	Control			Assisted Hatching			
	< 15 µm	≥ 15 µm	p-valor	< 15 µm	≥ 15 µm	p-valor	
Embs. Transferidos (Media ±ES)	22	16		18	22		
Nº embs. con reanudación correcta de mitosis (%)	1,91 ±0,06	2,00 ±0,09	NS	1,88 ±0,10	1,81 ±0,11	NS	
Gestación Clínica (%)	23 (54,7)	19 (59,4)	NS	22 (64,7)	21 (52,5)	NS	
Implantación (%)	12 (54,5)	6 (37,5)	NS	8 (44,4)	9 (40,9)	NS	
Implantación Global (%)	15 (33,3)	9 (28,1)	NS	12 (35,2)	10 (25,0)	NS	
Ciclos de Transferencia	23 (31,1)			19 (25,6)			NS

la tasa de implantación entre embriones frescos y vitrificados, algunos autores han señalado como una posible causa, el endurecimiento de la ZP tras el proceso de vitrificación. El endurecimiento de la

el transporte a través de la membrana y la liberación de sustancias para digerir la zona de forma local y selectiva (Sun et al., 2005).

debido al reducido tamaño muestral del estudio que podría enmascarar un efecto beneficioso del HA en los embriones desvitrificados, pero también podría deberse a un menor endurecimiento de

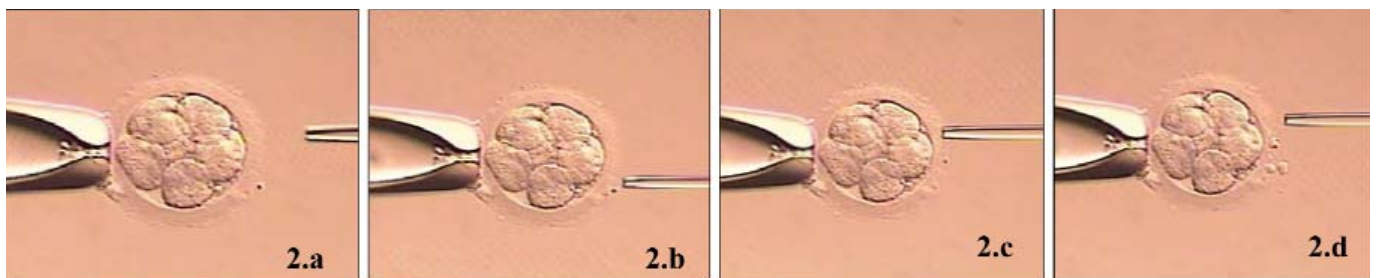


Figura 2: Hatching Asistido en un embrión desvitrificado.

zona, que ocurre espontáneamente tras la fecundación natural, ha sido descrito también tras la exposición prolongada a condiciones de cultivo artificiales y tras procedimientos de congelación lenta (Cohen et al.,1990, Tucker et al.,1991). Mientras que en la congelación de ovocitos, se produce un endurecimiento de la zona como consecuencia del elevado aumento de Calcio que desencadena la reacción cortical en respuesta al ProOH (Larman et al., 2007), la naturaleza exacta del daño producido en la ZP de los embriones no está clara y se apunta a cambios en las propiedades estructurales de las glicoproteínas de membrana que alteran la elasticidad y obstaculizan el proceso de adelgazamiento (Vanderwalzmen et al., 2003). Recientemente se ha otorgado especial atención a ZPT y ZPTV como parámetros morfológicos adicionales para la selección embrionaria, ya que es posible que el grosor de la zona pelúcida sea distinto en diferentes puntos, lo que según algunos autores, podría facilitar

Los resultados obtenidos en este estudio prospectivo no demuestran, en principio, ningún efecto beneficioso del Hatching Asistido sobre los grupos de control en términos de tasa de implantación o gestación. Autores como Garside o Gabrielsen demostraron que la medición del grosor de la zona pelúcida de los embriones in vitro podía actuar como un factor pronóstico de éxito en los ciclos de FIV y que su variación (ZPTV) frente a su media (ZPT) presenta una correlación mayor con las tasas de gestación (Gabrielsen et al., 2000, Sun et al., 2005). En nuestro estudio los resultados obtenidos tras la medición de ZPT y su variación (ZPTV) en fresco muestran una ligera disminución no significativa en la tasa de implantación de aquellos embriones con ZPTV superior inferior a 20 micras y ZPT superior a 15 micras. El HA aplicado en este grupo de estudio tampoco ha conseguido demostrar un aumento en la tasa de implantación de embriones desvitrificados. Este hecho podría ser

la zona en los embriones vitrificados respecto a los embriones congelados y que por ello el HA fuera menos beneficioso cuando se utiliza la vitrificación. Aunque existe preocupación por las consecuencias que la crioconservación pueda tener sobre la viabilidad y desarrollo de ovocitos y embriones, los resultados obtenidos en los últimos años con los métodos de vitrificación presuponen que pueda tener un impacto menor que la congelación lenta. Estudios recientes en

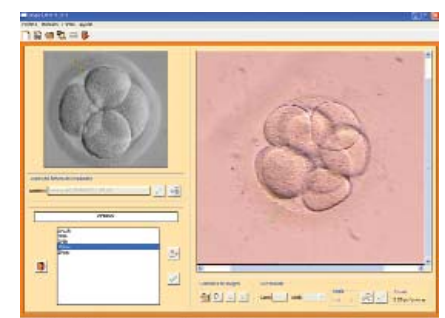


Figura 1: Análisis de ZPT y ZPTV en un embrión desvitrificado.

ovocitos maduros de ratones han valorado la respuesta del Calcio intracelular a la exposición de DMSO y EG. El aumento del Calcio que se observa como respuesta a la exposición al DMSO y al EG es transitorio en comparación con la respuesta prolongada y elevada que se produce con la exposición a PrOH y parte del endurecimiento observado puede reducirse eliminando el Calcio del medio de vitricación (Larman et al., 2006 y 2007). Además la cuantificación de proteoma y metaboloma en ovocitos ha revelado que la congelación lenta tiene un mayor impacto en su fisiología al mostrar un efecto significativo en la expresión de proteínas no observada en ovocitos vitricados (Larman et al. 2007). Aunque los últimos hallazgos indican que la vitricación es menos traumática que la congelación lenta, pocos estudios se han realizado para evaluar su impacto en embriones (Vanderzwalmen et al., 2003).

En conclusión, nuestros resultados no demuestran en principio ningún efecto beneficioso del Hatching Asistido en embriones desvitricados, si bien es necesario prolongar el estudio para poder valorar su utilidad en cada perfil de paciente dependiendo del grado de reactivación de la mitosis de los embriones y determinar, finalmente, si la vitricación, a diferencia de la congelación, no requiere la aplicación del HA más allá de lo indicado para embriones frescos.

BIBLIOGRAFÍA

Balaban B, Urman B, Yakin K, Isklar A. Laser-assisted hatching increases pregnancy and implantation rates in cryopreserved embryos that were allowed to cleave in Vitro after thawing: a prospective randomized study. *Hum. Reprod.* 2006; 21: 2136-2140.

Balaban B, Urman B, Ata B, Isiklar A, Larman MG, et al. A randomized controlled study of human Day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitricación: vitricación is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. *Hum Reprod* 2008; 23: 1976-1982

Check H, O'Shaughnessy A, Hoover L, Summers D, Nazari A. The effect of assisted hatching on pregnancy rates after frozen embryo transfer. *Fertil Steril* 1996; 65: 254-257

Cohen J, Wiemer KE, Wright G. Prognostic value of morphologic characteristics of cryopreserved embryos: a study using videocinematography. *Fertil Steril* 1988; 49: 827-834.

Cohen J, Elsner C, Kort H, Malter H, et al., Impairment of hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisted hatching using micromanipulation. *Hum. Reprod.* 1990; 5: 7-13

Edi-Osgie E, Hooper L, Seif MW. The impact of assisted hatching on live birth rates and outcomes of assisted conception: a systematic review. *Hum. Reprod* 2003; 18: 1828-1835

Ferrer E, Vila M, Ferrer M, Calatayud C, Ruiz M. Eficacia de la vitricación de embriones: Resultados de Crea Tras dos años de experiencia. IV Congreso ASEBIR; 2007 Nov 21-23; Bilbao, España.

Ferrer M, Vila M, Ferrer E, Calatayud C, Ruiz M. Gestación tras revitricación embrionaria en estadio de pronúcleos y en día +3. IV Congreso ASEBIR; 2007 Nov 21-23; Bilbao, España.

Garside WT, Loret de Mola JR, Bucci JA, Tureck RW, Heyner S. Sequential análisis of zona thickness during in Vitro culture of human zygotes: correlation with embryo quality. *Mol Reprod Dev.* 1997; 47: 99-104.

Gabrielesen A, Bhatnager PR, Petersen K, et al., Influence of zona pellucida thickness of human embryos on clinical pregnancy outcome following in vitro fertilization treatment. *J Assit Reprod Genet.* 2000; 17: 323-328

Gabrielesen A, Agerholm I, Toft B, Hald F, Petersen K, et al., Assited Hatching improves implantation rates on cryoreserved-thawed embryos. A randomized prospective study. *Hum. Reprod.* 2004. 19: 2258-2262

Ge HS, Zhou W, Zhang W, Lin JJ. Impact of assisted hatching on fresh and frozen-thawed embryo transfer cycles: a prospective, randomized study. *Reprod Biomed Online* 2008; 16: 589-96.

Hiraoka K, Fuchiwaki M, Hiraoka K, et al., Effect of the size of ZP opening by laser assisted hatching on clinical outcome of

frozen cleaved embryos that were cultured to blastocyst after thawing in women with multiple implantation failures of embryo transfer: retrospective study. *J Assit Reprod Genet.* 2008; 25: 129-135

Ko CS, Ding DC, Chu TW, Chu YN, Chen IC, et al., Changes to the meiotic spindle and zona pellucida of mature mouse oocytes following different cryopreservation methods. *Anim Reprod Sci* 2008, 105:272-82.

Kuleshova LL, Lopata A. Vitricación can be more favourable than slow cooling. *Fertil Steril* 2002 ;78:449-54

Larman MG, Sheehan CB, Gardner DK. Calcium-free vitricación reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocyte. *Reproduction.* 2006;131:53-61.

Larman MG, Katz-Jaffe MG, Sheehan CB, Gardner DK. 1,2-propanediol and the type of cryopreservation procedure adversely affect mouse oocyte physiology. *Hum Reprod.* 2007; 22:250-9.

Liebermann, Michael J. Tucker Comparison of vitricación and conventional cryopreservation of day 5 and day 6 blastocysts during clinical application .

Fertil. Steril. 2006; 86: 20-26
Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Pados G, et al. Cryopreservation of human embryos by vitricación or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2008; 90: 186-193

Moreira da Silva F, Metelo R. Relation between physical properties of the zona pellucida and viability of bovine embryos after slow-freezing and vitricación. *Reprod Domest Anim.* 2005; 40:205-9.

Ng EHY, Naveed F, Lau EYL, Yeung WSB, Chan CCW, Tang OS et al., A randomized double-blind controlled

Study of the efficacy of laser-assisted hatching on implantation and pregnancy rates of frozen-thawed embryo transfer at the cleavage stage. *Hum. Reprod.* 2005. 20: 979-985

Rama Raju GA, Prakash GJ, Krishna KM, Madan K. Neonatal outcome vitricated day 3

embryo transfers: a preliminary study. *Fertil Steril.* 2008; 8. Epub 2008 Jun 10.

Sallam HN, Sadek SS, Agameya AF. Assisted hatching. A meta-analysis of randomized controlled trials. *J Assist Reprod Genet.* 2003; 20:332-42.

Seif MM, Edi-Osagie EC, Farquhar C, Hooper L, Blake D, McGinlay P. Assisted hatching on assisted conception (IVF & ICSI). *Cochrane Database Syst Rev.* 2006; 25:CD001894.

Sifer C, Sellami A, Poncelet C, Kulski P, et al., A prospective randomized study to assess the benefit of partial zona pellucida digestion before frozen-thawed embryo transfers. *Hum Reprod.* 2006. 21: 2384-2389

Stehlik E, Stehlik J, Katayama KP, Kuwayama M, Jambor V, Brohammer R, Kato O. Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. *Reprod Biomed Online.* 2005;11:53-7

Sun YP, Xu Y, Cao T, Su YC, Guo YH. Zona pellucida thickness and clinical pregnancy outcome following in vitro fertilization. *Int J Gynaecol Obstet.* 2005; 89:258-62

Takahashi K, Mukaida T, Goto T, Oka C. Perinatal outcome of blastocyst transfer with vitrification using cryoloop: a 4-year follow-up study. *Fertil Steril.* 2005; 84:88-92

Tucker MJ, Cohen J, Massey JB, et al., Partial zona dissection of zona pellucida of frozen thawed human embryo may enhance blastocyst hatching, implantation, and pregnancy rate. *Am J Obstet Gynecol.* 1991, 165:341-4.

Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online.* 2006; 12: 779-96. Review

Valojerdi MR, Eftekhari-Yazdi P, Karimian L, Ashtiani SK. Effect of laser zona pellucida opening on clinical outcome of assisted reproduction technology in patients with advanced female age, recurrent implantation failure, or frozen-thawed embryos. *Fertil. Steril.* 2008. 90: 84-91

Valojerdi MR, Eftekhari-Yazdi P, Karimian L, Hassani F, Movaghar B. Vitrification versus

slow freezing gives excellent survival, post warming embryo morphology and pregnancy outcomes for human cleaved embryos. *J Assist Reprod Genet.* 2009 Jun 10 (Epub ahead of print)

Van den Abbeel E, Van Steirghem A. Zona pellucida damage to human embryos after cryopreservation and the consequences for their blastomere survival and in-vitro viability. *Hum. Reprod.* 2000; 15: 373-378
Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche Ch, Standaert V, et al., Vitrification of human blastocysts with the Hemi-Straw carrier: application of assisted hatching after thawing. *Hum Reprod.* 2003;18:1504-11.

Ziebe S, Bech B, Petersen K, Mikkelsen AL, Gabrielsen A, Andersen AN. Reassumption of mitosis during post-thaw culture: a key parameter in selecting the right embryos for transfer. *Hum Reprod.* 1998;13:178-81.



C O M U N I C A C I O N E S O R A L E S

001: ANÁLISIS DE LA CALIDAD OVOCITARIA MEDIANTE EL CONSUMO DE OXÍGENO; RELACIÓN CON FECUNDACIÓN, DESARROLLO Y CALIDAD EMBRIONARIA

A. Tejera, J. Herrero, P. Romero, M. J. de los Santos, J. Remohí, M. Meseguer IVI, Valencia

INTRODUCCIÓN:

La calidad ovocitaria es fundamental para el posterior desarrollo embrionario, ya que este depende en gran medida de la maquinaria celular del mismo y condiciona el éxito reproductivo subsiguiente. La necesidad de generar nuevos métodos cuantitativos de evaluación ovocitaria para evaluar el potencial reproductivo de las cohortes de las pacientes está promoviendo el desarrollo de nuevas técnicas no invasivas. Las mediciones de actividad metabólica en ovocitos pueden tener un valor predictivo del potencial desarrollo embrionario, el consumo de oxígeno se ha considerado como el mejor indicador de actividad metabólica, ya que este está directamente relacionado con la capacidad del ovocito para producir ATP. Nuestro objetivo es evaluar la capacidad diagnóstica del consumo de oxígeno ovocitario como marcador de calidad correlacionándolo con la fecundación, posterior calidad y desarrollo embrionario.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Realizamos un estudio de cohortes de carácter prospectivo y observacional para determinar la validez del método automatizado y cuantitativo proporcionado por el Embroscope (Unisense, Dinamarca). Analizamos un total de 146 ovocitos de donantes recibidos por 30 parejas incluidas en el programa de donación de ovocitos, en su primer intento y con los que posteriormente se realizó la inseminación mediante ICSI y transferencia embrionaria a las 72 horas. En el estudio analizamos la mitad de la cohorte ovocitaria y los criterios de inclusión/exclusión incluyeron un índice de masa corporal < 30 kg/m², ausencia de patología uterina (miomas, adenomiosis, malformaciones uterinas adquiridas o congénitas), endometriosis,

hidrosalpinx e historia de pérdida gestacional recurrente. Sobre los ovocitos analizamos la respiración media en fentomoles de oxígeno/hora. Consideraremos para el estudio una serie de variables independientes relacionadas con el desarrollo embrionario: la fecundación, la formación de un embrión óptimo a las 48 horas (entre 3-5 blastómeras, <20 de fragmentación, ausencia de multinucleación y buena simetría) y el destino final de los embriones obtenidos a las 72 horas de la inseminación (por orden de calidad; Transferidos, Congelados o No-viables). Las

mediciones de oxígeno se tomaron por duplicado en intervalos de 30 minutos, expresándose la media de ambas. En cada experimento se utilizaron pocillos sin ovocitos que sirvieron como "blanco" para valorar los niveles basales de concentración de oxígeno. Las mediciones se realizaron con un sensor electroquímico (sensibilidad = 0,05 fmoL de Oxígeno/h). El análisis estadístico se realizó mediante regresión logística, siendo la respiración ovocitaria la variable dependiente. También realizamos un estudio ANOVA para comparar los niveles de respiración en función de la calidad de los embriones a las 72 horas y en función de su destino final mediante el software SPSS 17.

3,04-3,50) (rango 0,00-7,19). El análisis de regresión logística reveló una ausencia de relación entre la respiración embrionaria y la posterior fecundación tras la microinyección espermática OR=1,180 (IC95% 0,813-1,713). También determinó la asociación entre altos niveles de respiración ovocitaria y mala calidad embrionaria a las 48 horas OR=0,562 (IC95% 0,370-0,852). Finalmente, en la siguiente tabla se presentan los valores medios de respiración ovocitaria según el destino final que experimentaron los embriones obtenidos a partir de estos ovocitos.

Destino final de los embriones	Consumo de Oxígeno (fmol/h)	(IC95%)
Transferidos	2,24	1,65-2,83
Congelados	3,13	2,81-3,47
No-Viables	3,64	3,31-3,96

mediciones de oxígeno se tomaron por duplicado en intervalos de 30 minutos, expresándose la media de ambas. En cada experimento se utilizaron pocillos sin ovocitos que sirvieron como "blanco" para valorar los niveles basales de concentración de oxígeno. Las mediciones se realizaron con un sensor electroquímico (sensibilidad = 0,05 fmoL de Oxígeno/h). El análisis estadístico se realizó mediante regresión logística, siendo la respiración ovocitaria la variable dependiente. También realizamos un estudio ANOVA para comparar los niveles de respiración en función de la calidad de los embriones a las 72 horas y en función de su destino final mediante el software SPSS 17.

El análisis de varianza reveló diferencias significativas entre los valores presentados p<0,0001.

CONCLUSIONES: Existe una relación directa muy intensa entre los valores de respiración ovocitaria y la calidad embrionaria obtenida tras el proceso de inseminación (en día 2). Los datos obtenidos sugieren la utilidad de la respiración ovocitaria como marcador de calidad, pudiendo ser una herramienta de interés para la selección de los ovocitos con mayores probabilidades de éxito, aumentando así las posibilidades de implantación.

RESULTADOS:

la tasa media de respiración ovocitaria observada en nuestra población de ovocitos fue de 3,27 fmoL/h (IC95%

002:ANÁLISIS DE LA INDUCCIÓN DE LA REACCIÓN ACROSÓMICA EN EL ESPERMATOZOIDE HUMANO MEDIANTE EL USO DE ZP3 RECOMBINANTE EXPRESADA EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES DE OVARIO DE HÁMSTER CHINO CON GLICOSILACIÓN MODIFICADA.

M. T. Zomeño-Abellán¹, M. A. Ramírez², A. Gutiérrez-Adán², M. J. Izquierdo-Rico¹, M. Jiménez-Movilla¹, J. L. Girela³, M. J. Gómez-Torres³, J. de Juan³, J. Ballesta¹, J. C. Martínez⁴, J. Landeras⁴, M. Avilés¹.

¹Departamento de Biología Celular e Histología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Murcia. ²Departamento de Reproducción Animal, INIA, Madrid. ³Departamento de Biotecnología, Universidad de Alicante, Alicante. ⁴IVI, Murcia.

INTRODUCCIÓN:

El acrosoma es una estructura vesicular que cubre la parte anterior del núcleo del espermatozoide. Para que la fecundación tenga lugar es necesario que se produzca la reacción acrosómica (RA). La RA se produce por la fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática en diferentes puntos. Este proceso lleva consigo la liberación de las enzimas acrosomales que junto con la motilidad espermática permiten al espermatozoide atravesar la zona pelúcida (ZP) y la fecundación. La RA es iniciada por progesterona y la ZP. La ZP está formada por cuatro proteínas denominadas ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4. Se ha descrito que ZP3 induce la RA en espermatozoides capacitados. Varios estudios indican que los carbohidratos juegan un papel clave en la interacción espermatozoide-ovocito; sin embargo, el grado de implicación y tipo de carbohidrato implicado sigue siendo aún tema de controversia. Estos estudios son limitados debido a la escasez de ZP disponibles. Por ello, la producción de proteínas recombinantes de la ZP permite la obtención de material suficiente para realizar estudios básicos acerca de la interacción entre gametos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

El cDNA de ZP2 y ZP3, (donados por el Dr. Dean, NIH) fue subclonado en el plásmido de expresión pEGFP-N1 (Clontech). Las construcciones se electroporaron en células de ovario de hámster chino (CHO) para obtener clones constitutivamente expresando ZP2 y ZP3. Además ZP3 también se utilizó para transformar CHO lec1 y CHO lec8 que tienen su glicosilación modificada. CHO lec1 tiene

carencia en la actividad de la N-acetilglucosamintransferasa I impidiendo la formación de carbohidratos del tipo N-unidos complejos; mientras que CHO lec8 produce glicoproteínas con déficit del azúcar galactosa. Se obtuvieron 10 muestras seminales procedentes de ocho donantes, previo consentimiento informado de los mismos. Las muestras una vez lavadas fueron capacitadas mediante swim-up durante 1 hora a 37°C y 5% CO2 en medio HTF suplementado con HSA. Los ensayos de RA se hicieron con 10 millones de espermatozoide por mililitro y se midió la inducción de RA mediada por las diferentes glicoproteínas de la ZP secretadas por las CHO a una concentración de proteína total de 1 µg/µl, progesterona (10 y 3,2 µM) y el ionóforo de calcio (10 µM) utilizando la lectina *Pisum sativum*. La vitalidad espermática fue determinada mediante el ensayo de eosina-nigrosina.

RESULTADOS:

El análisis mediante Western-blot mostró la presencia de ZP3 con un peso molecular aproximado de 60 kDa, 39 kDa y 42 kDa para las células CHO, CHO lec1 y CHO lec8 respectivamente.

El sobrenadante que contiene la proteína recombinante ZP3 producida en células CHO, CHO lec1 y CHO lec8 produjo una RA del 46,4, 29,13 y 28,9% respectivamente. Se observa únicamente un incremento estadísticamente significativo con la ZP3 producido en CHO. Progesterona a 3,2 y 10 M indujo 50,5 y 52,1% de RA respectivamente. El porcentaje de RA en las muestras incubadas con la proteína ZP2 y sin tratamiento fue de 27,7 y 27,5% respectivamente. El ionóforo de calcio

indujo un 84,8% de RA. Tras todos los tratamientos la vitalidad espermática se mantuvo aproximadamente alrededor del 90%, excepto en el tratamiento con ionóforo en el que la vitalidad descende hasta un 13%.

CONCLUSIONES:

En conclusión, ZP3 producida en CHO muestra una actividad biológica similar a progesterona, mientras que ZP3 producida en CHO lec1 y CHO lec8 no induce un incremento de la RA comparado con la RA espontánea y con ZP2. Estos resultados indican que cambios en el patrón de glicosilación de la ZP3 humana producen una pérdida de su actividad biológica implicando muy probablemente la participación de cadenas oligosacáridicas del tipo N- y O-unidas.

Estudio financiado por la Fundación Séneca de la Región de Murcia 0452/GERM/2006 y IVI-Murcia.

003: FERTILIDAD PREVIA EN DONANTES DE OVOCITOS: ¿FACTOR PREDICTIVO DE EMBARAZO?

L. Echeverría¹, E. Clua¹, M. Boada¹, L. Latre¹, F. Martínez¹, A. Veiga^{1, 2}.

¹Departament d'Obstetrícia, Ginecologia i Reproducció de USP Institut Universitari Dexeus. Barcelona. ²Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMRB). Barcelona

INTRODUCCIÓN:

Desde que en 1983 Lutjen y colaboradores desarrollaron la técnica de la donación de ovocitos, su utilidad y el alcance de sus aplicaciones ha ido en aumento en los últimos años. Entre los factores descritos que condicionan los resultados de la donación destacan la edad de la donante, la edad de la receptora y el número de ovocitos obtenido. Algunos estudios contemplan la fertilidad previa de la donante como variable que puede afectar la eficacia de la técnica.

Objetivo: Comprobar si hay diferencias significativas entre las tasas de embarazo de pacientes receptoras de ovocitos procedentes de donantes con fertilidad probada (partos, abortos o interrupciones legales del embarazo) y las de receptoras de ovocitos de donantes nuligrávidas. Se pretende también determinar si el hecho de haber conseguido un embarazo en un primer ciclo repercute sobre la posibilidad de éxito en una segunda donación.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo que incluye un total de 605 ciclos sincrónicos procedentes de 504 donantes, llevados a cabo en el Institut Universitari Dexeus (Mayo 2005- Diciembre 2007).

Variables analizadas para las donantes: Edad de la donante, gravidez, dosis de gonadotropinas, [E2] en día de HCG, ovocitos totales recuperados, número de ovocitos MII, número de ovocitos asignados/receptora, número de ovocitos MII asignados/receptora.

Variables analizadas para las receptoras: edad de la receptora, tasa de fecundación, número de embriones evolutivos, número de embriones transferidos y tasa de embarazo.

El análisis estadístico utilizado fue el test Chi-cuadrado, Fisher, T-Student con $\alpha=0.05$ y regresión logística multivariable.

RESULTADOS: La media de edad de las donantes fue de 27.4 ± 4.5 años.

Del total de 504 donantes, 236 eran grávidas y 268 nuligrávidas. Repitieron ciclo de donación 62 donantes (12.3%).

Comparando las distintas variables analizadas para los dos grupos sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) en la media de edad de las donantes siendo superior en el grupo de donantes grávidas (29.3 ± 3.9) respecto al de nuligrávidas (25.7 ± 4.5) y en el número de ovocitos recuperados, siendo significativamente ($p<0.05$) inferior en el grupo de donantes grávidas (15.2 ± 7.2 vs 16.5 ± 7.4)

La media de edad de las receptoras fue de 41.7 ± 5.7 años.

En 294 (48.6%) ciclos las pacientes receptoras recibieron ovocitos procedentes de donantes con fertilidad probada consiguiéndose 158 (53.7%) embarazos. Los 311 ciclos restantes procedían de donantes nuligrávidas y se consiguieron 172 (55.3%) embarazos, no observándose diferencias estadísticamente significativas.

De las 62 donantes con más de un ciclo realizado, 36 (58.1%) dieron lugar a embarazo en el primer ciclo de donación. De éstas, 19 (52.8%) generaron un segundo embarazo. Mientras que de las 26 que no dieron lugar a embarazo en el primer ciclo, 19 (73.1%) sí lo hicieron en el segundo ciclo. No observándose diferencias significativas.

CONCLUSIONES:

En este estudio, la fertilidad anterior de

la donante no es un factor predictivo de embarazo para las receptoras así como tampoco parece serlo el hecho de haber dado lugar a un embarazo en un ciclo anterior de donación. Por ello, consideramos que la fertilidad previa de la donante y/o el haber generado embarazo en ciclos anteriores no deberían constituir requisitos imprescindibles para la aceptación de las candidatas.

004: IDENTIFICACIÓN DE EMBRIONES DE RATÓN MEDIANTE MICROPARTÍCULAS CODIFICADAS DE POLISILICIO

S. Novo¹, R. Gómez¹, L. Barrios¹, M. Duch², J. Esteve², J. A. Plaza², J. Santaló¹, C. Nogués¹, E. Ibáñez^{1*}

¹Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra

²Instituto de Microelectrónica de Barcelona, IMB-CNM (CSIC), Campus Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra

INTRODUCCIÓN:

En las clínicas de reproducción asistida, la simultaneidad de ciclos puede comportar problemas de trazabilidad de los gametos/embriones. ESHRE propone la supervisión de todo el proceso por una segunda persona, pero esta acción no elimina la posibilidad de cometer errores. Con el fin de automatizar el proceso de control de trazabilidad, se comercializan productos para etiquetar e identificar automáticamente el material de laboratorio utilizado. No obstante, como el material reproductivo debe cambiar de recipiente a lo largo del proceso, estas herramientas no son suficientes para evitar los problemas de trazabilidad. Una alternativa es el marcaje directo de los gametos/embriones mediante micropartículas codificadas (microdispositivos) de polisilicio. Concretamente, el objetivo de este trabajo fue determinar la validez de esta aproximación como sistema de codificación embrionario mediante la introducción de microdispositivos en el espacio perivitelino (EPV) de embriones de ratón.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Los microdispositivos fueron fabricados mediante microtecnologías de silicio. Se diseñaron tres modelos (A, B y C) con diferentes formas, dimensiones y sistemas de codificación. Los microdispositivos fueron microinyectados en el EPV de cigotos de ratón, que se cultivaron in vitro hasta el estadio de blastocisto. Se valoró la viabilidad embrionaria, la retención de los microdispositivos en el EPV durante todo el periodo de cultivo in vitro, la identificabilidad de los embriones y la liberación de los microdispositivos en el momento de la eclosión. Inicialmente se microinyectó un microdispositivo de cada

modelo por embrión con el objetivo de determinar el modelo más idóneo. Posteriormente se determinó el número de microdispositivos necesarios para alcanzar una identificación embrionaria próxima al 100%.

RESULTADOS:

No se detectaron diferencias significativas para ninguno de los parámetros analizados entre los tres modelos de microdispositivos (ver

automatizado de lectura, para ello y a fin de simularlo, el proceso de identificación se realizó sin manipulación de los embriones. Finalmente, se valoró la liberación de los microdispositivos después de la eclosión del embrión, puesto que el objetivo del sistema es mantener identificado al embrión únicamente durante su cultivo in vitro. La tasa de liberación disminuye significativamente al aumentar el número de microdispositivos presentes.

Grupo de embriones	Modelo y (número) de microdispositivos por embrión	Nº embriones	Nº blastocistos (%)	Tasa de retención (%)	Tasa de liberación (%)	Tasa de identificación (%)
Control	-	125	108 (86,4)	-	-	-
Inyectados	A (1)	80	68 (85,0)	92,6 ^a	n.d.	55,6 ^a
	B (1)	80	63 (78,8)	93,7 ^a	n.d.	44,8 ^a
	C (1)	80	66 (82,5)	100 ^a	n.d.	45,8 ^a
	C (2)	80	70 (87,5)	82,5 ^b	75,9 ^a	75,8 ^b
	C (3)	80	68 (85,0)	83,8 ^b	54,4 ^b	91,1 ^c
	C (4)	80	76 (95,0)	82,9 ^b	17,5 ^c	96,5 ^d

a, b, c, d Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las diversas filas de la misma columna ($c_2: p < 0,05$)

n.d. = no determinado.

tabla), pero se seleccionó el modelo C por considerarse el de más fácil lectura al microscopio. Se comprobó que tanto el método de incorporación como el propio microdispositivo, independientemente del modelo o número, no afectan al desarrollo in vitro de los embriones. La tasa de retención del total de microdispositivos disminuyó significativamente cuando se microinyectaron dos o más por embrión, aunque el 100% de los embriones retuvo como mínimo un microdispositivo. La tasa de identificación embrionaria incrementó significativamente al aumentar el número de microdispositivos por embrión. Es importante destacar que, el objetivo final es disponer de un sistema

CONCLUSIONES:

El sistema de codificación embrionario presentado demuestra su utilidad, considerando la tasa de supervivencia e identificación obtenida. No obstante, el laborioso método de incorporación y la baja tasa de liberación de los microdispositivos después de la eclosión, requieren una mejora del sistema o la búsqueda de alternativas. En este sentido, actualmente estamos trabajando en el desarrollo de un sistema alternativo de etiquetaje externo mediante microdispositivos de polisilicio funcionalizados para adherirse a la zona pelúcida.

005: DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA Y LOCALIZACIÓN DE LOS PRECURSORES PROTEICOS DE LOS PÉPTIDOS OPIOIDES POMC Y PDYN EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS

N. Subirán^{1, 2}, F. M. Pinto², J. L. de Pablo³, M. Fernández-Sánchez⁴, M. L. Cadenas², y J. Irazusta¹.

¹ Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina y Odontología. UPV/EHU. Leioa, Bizkaia. ² Laboratorio de Farmacología. Instituto de Investigaciones Químicas, CSIC-Universidad de Sevilla. Sevilla. ³ Laboratorio FIV. Clínica de Reproducción Asistida Quirón. Bilbao, Bizkaia. ⁴ Laboratorio de Andrología. Instituto Valenciano de Infertilidad, Fundación IVI. Sevilla.

INTRODUCCIÓN:

El sistema opioide se encuentra ampliamente distribuido en el aparato reproductor masculino regulando a múltiples niveles la función reproductora (1). Los péptidos opioides se generan por hidrólisis de precursores proteicos. La pro-enkefalina (PENK), la proopiomelanocortina (POMC) y la prodinorfina (PDYN) son los precursores proteicos de las enkefalinas, las endorfinas y la dinorfinas respectivamente. Estos péptidos bioactivos ejercen su acción a través de los receptores opioides presentes en espermatozoides humanos (2). Por lo tanto, nuestro objetivo fue analizar la expresión y localización de POMC y PDYN en espermatozoides humanos para determinar si el espermatozoide es capaz de generar péptidos opioides endógenos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

La expresión y localización de POMC y PDYN se determinó por RT-PCR e inmunocitoquímica respectivamente en espermatozoides capacitados aislados mediante gradiente de Percoll.

RESULTADOS:

Mediante RT-PCR detectamos el mRNA del precursor PDYN en espermatozoides maduros, pero no observamos la presencia del mensajero que codifica para el precursor POMC. La PDYN se localiza en la región ecuatorial de la cabeza espermática formando un anillo, mientras que POMC aparece exclusivamente en la cola espermática.

CONCLUSIONES:

Los precursores opioides POMC y PDYN presentan una expresión génica

diferencial lo que confirma la existencia de una población estable y selectiva de RNAs en espermatozoides maduros cuyo perfil podría ser utilizados como diagnóstico en los tratamientos de infertilidad masculina. Las diferencias de localización de POMC y PDYN indican que los péptidos generados a partir de estos precursores podrían estar regulando diferentes procesos ya que los espermatozoides, debido a la alta polarización estructural y funcional, compartimentalizan metabolitos específicos y vías de señalización en regiones donde los necesita.

1. Fabbri A, Jannini EA, Gnessi L, Ulisse S, Moretti C, Isidori A. Neuroendocrine control of male reproductive function. The opioid system as a model of control at multiple sites. *J Steroid Biochem.* 1989 Jan;32(1B):145-50. Review.

2. Agirregoitia E, Valdivia A, Carracedo A, Casis L, Gil J, Subirán N, Ochoa C, Irazusta J. Expression and localization of delta-, kappa-, and mu-opioid receptors in human spermatozoa and implications for sperm motility. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Dec; 91(12):4969-75.

AGRADECIMIENTOS:

Trabajo financiado por el MEC (BFU2006-07779), la Diputación Foral de Bizkaia (7/12/EK/2006/61) y la Junta de Andalucía (P08-CVI-04185). N. Subirán posee una Ayuda de Formación del Personal Investigador de la UPV/EHU

006: APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DEL EMBRIOSCOPE PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA CALIDAD OVOCITARIA MEDIANTE EL ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE RESPIRACIÓN

J. Herrero, A. Tejera, J. M. de los Santos, M. J. de los Santos, A. Pellicer, M. Meseguer. IVI, Valencia

INTRODUCCIÓN:

En la actualidad el único método de rutina utilizado para valorar la calidad ovocitaria se basa en criterios morfológicos sometidos a la subjetividad del observador. La necesidad de generar nuevos métodos cuantitativos de evaluación ovocitaria que mejoren la selección y más aun las tasas de

serie de variables independientes relevantes en el desarrollo del ciclo de reproducción asistida: edad, días de estimulación, último Estradiol y Progesterona en sangre, nº de ovocitos recuperados y nº de metafase II obtenidos. El ovocito fue situado en pocillos con medio de cultivo (HTF; Human Tubal Fluid). El oxígeno llega al embrión por difusión a través del propio

RESULTADOS:

la tasa media de respiración ovocitaria observada en nuestra población de ovocitos fue de 3,27 fmoL/h (IC95% 3,04-3,50) (rango 0,00-7,19). En la siguiente tabla se presentan los datos de los coeficientes de correlación de Pearson entre las variables clínicas analizadas y la tasa media de respiración

	Edad	Días de estimulación	Dosis Total de Gonadotropinas	Estradiol	Progesterona	Nº de total de ovocitos	Nº de MII
Coefficiente de correlación	-0,113	0,046	-0.511	-0,066	-0,368	0,048	0,033
P valor	0,174	NS	0,0001	NS	0,0001	NS	NS

implantación, está promoviendo el desarrollo de nuevas técnicas no invasivas. En este sentido, la actividad metabólica ovocitaria puede actuar como predictor del potencial desarrollo embrionario y la medición del consumo de oxígeno ha sido considerada como su mejor indicador, ya que está directamente relacionado con la capacidad del ovocito para producir ATP. Nuestro objetivo es evaluar la capacidad diagnóstica del consumo de oxígeno ovocitario como marcador de calidad correlacionándolo con determinados valores clínicos de la paciente.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Realizamos un estudio de cohortes de carácter prospectivo y observacional para determinar la validez del método automatizado y cuantitativo proporcionado por Embrioscope (Unisense, Dinamarca). Analizamos un total de 146 ovocitos procedentes de 30 donantes incluidas en un programa de donación de ovocitos. La respiración media ovocitaria fue analizada en fentomoles de oxígeno/hora. Consideraremos para el estudio una

medio por las capas superiores en contacto con el aceite mineral. A medida que el embrión consume oxígeno la concentración se reduce desde la base (donde está el ovocito) hacia la superficie y este gradiente lineal es valorado por un microsensor. Las mediciones de oxígeno se tomaron por duplicado en intervalos de 30 minutos, obteniendo una información puntual. En cada experimento se utilizaron pocillos sin ovocitos que sirvieron como "blanco" para valorar los niveles basales de gradiente de oxígeno. Las mediciones se realizaron con un sensor electroquímico (Tipo Clark) cuya sensibilidad es de 0,05 fmoL de oxígeno/h. El tiempo empleado para medir la respiración de cada ovocito fue de aproximadamente 90 segundos.

El análisis estadístico se realizó mediante regresión lineal, siendo la respiración ovocitaria la variable dependiente. Construimos un modelo predictivo de regresión donde utilizamos un proceso de selección siguiendo el protocolo forward step del SPSS 17.

ovocitaria.

Tras el proceso de forward-step se generó un modelo en el que las variables relevantes que condicionan la respiración ovocitaria se ordenan por este orden: Dosis total de gonadotropinas, Progesterona en sangre y Edad. El coeficiente de correlación del modelo ajustado r fue de 0,591, $p > 0,0001$.

CONCLUSIONES:

Existe una importante relación lineal entre la respiración ovocitaria y determinados valores clínicos relevantes para el éxito reproductivo. La utilización de altas dosis de gonadotropinas, la luteinización prematura o la edad avanzada afectan a la calidad ovocitaria reflejándose en niveles de respiración reducidos. Los datos obtenidos sugieren la utilidad de la respiración como marcador de calidad ovocitaria, evitando la subjetividad e inconsistencia que proporcionan la evaluación de los dismorfismos ovocitarios.

007: EL CULTIVO DE EMBRIONES EN BAJAS TENSIONES DE OXÍGENO, MEJORA LAS TASAS DE GESTACIÓN E IMPLANTACIÓN EN CICLOS DE DONACIÓN DE OVOCITOS: RESULTADOS PRELIMINARES

P. Gámiz, A. Tejera, J. M. De Los Santos, S. Pérez, C. Albert, P. Romero, M. J. De Los Santos.
 Instituto Valenciano de Infertilidad. IVI, Valencia

INTRODUCCIÓN:

Los embriones humanos pueden crecer en concentraciones de oxígeno atmosféricas (20%) o reducidas (5%). Bajas tensiones de O₂ durante el cultivo embrionario in vitro intentan reproducir las condiciones in vivo a las que están sometidas ovocitos y embriones, pero los resultados obtenidos en distintos estudios con respecto al cultivo en hipoxia no son concluyentes. Recientemente han salido publicados varios trabajos prospectivos y aleatorios en los que se muestran los beneficios del cultivo embrionario en hipoxia hasta el estadio de blastocisto. Nosotros hemos querido evaluar si esto mismo ocurre en embriones transferidos en día +3 de desarrollo y si hay alguna implicación en la calidad embrionaria así como en las tasas de gestación e implantación.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se realizó un estudio prospectivo en un total de 939 ciclos de nuestro programa de donación de ovocitos: 481 ciclos (3754 embriones) fueron cultivados a 37°C, 5,5% de CO₂ y 20% de O₂ y 458 ciclos (3192 embriones) en las mismas condiciones de temperatura y CO₂ pero con un 5% de O₂. En ambos casos se utilizaron incubadores trigas SANYO MCI 5M. Ovocitos y embriones fueron cultivados en microgotas de 50µl de HTF bajo aceite mineral. La morfología embrionaria fue evaluada en día +2 y +3 de desarrollo según nº de células, grado y patrón de fragmentación, multinucleación, simetría y tamaño de las células. Todas las transferencias se realizaron en día +3, el test de embarazo se realizó 13 días después mediante la determinación sérica de βHCG y una semana más tarde se confirmó la presencia de saco gestacional por ecografía vaginal. Los datos se analizaron con el test exacto de Fisher y

valores de p<0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS:

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los 2 grupos, en tasas de fecundación (70.9% vs. 71.8%) ni tasas de gestación totales (60.3% vs. 53.4%). Sin embargo, el porcentaje de embriones de buena calidad en día +2 y día +3 fue significativamente mayor en el grupo de embriones cultivados en baja tensión de O₂, 60.0% vs. 54.0% en día +2 y 64.1% vs. 58.0% en día +3, así como la tasa de gestación clínica (55.9% vs. 46.2%) y la tasa de implantación (38.2% vs. 31.7%).

	5%O ₂	20%O ₂	
Nº de ciclos	458	481	----
Edad media	40.82	40.8	NS
% transfer	92.3	91.8	NS
Tasa de fecundación	70.9	71.8	NS
% embriones ok en día +2	60.0	54.0	P<0.0001
% embriones ok en día +3	64.1	58.0	P<0.0001
Media embriones transferidos	1.96	1.95	NS
Tasa de gestación	60.3	53.4	NS
Tasa de gestación clínica	55.9	46.2	P=0.0046
Tasa de gestación evolutiva	46.3	38.04	P=0.0140
Tasa de implantación	38.2	31.66	P=0.0046

CONCLUSIONES:

El cultivo de embriones humanos en bajas presiones de O₂ mejora la calidad de los embriones en día +2 y día +3 e incrementa las tasas de gestación clínica e implantación de forma significativa. Esta mejora en los resultados puede ser debida a una menor formación de especies reactivas de oxígeno que pueden afectar al desarrollo embrionario in vitro y por tanto a su capacidad de implantación.

008: INFLUENCIA DE LA MULTINUCLEACIÓN EN LAS TASAS DE IMPLANTACIÓN Y DE ABORTO EN UN PROGRAMA DE FECUNDACIÓN IN VITRO.

C. Alonso, M. Lara, B. Buch, C. Segura, R. Garnica, M. Martínez-Moya
Unidad de Reproducción, Centro Gutenberg. Málaga

INTRODUCCIÓN:

La multinucleación en embriones humanos es un fenómeno común que se muestra tanto en embriones in vitro como in vivo. Se puede originar por una división nuclear (cariocinesis) sin que haya división celular (citocinesis), por una fragmentación del núcleo o por una migración defectuosa durante la anafase mitótica. La multinucleación aparece en aproximadamente el 15%-20% de los embriones desarrollados in vitro (ref. 1). La presencia de blastómeras multinucleadas está asociada con un pobre desarrollo embrionario en los ciclos de FIV, lo que supone una bajada en las tasas de implantación (ref. 1,2,5) y en la tasa de formación de blastocisto (ref. 1,2). Numerosos trabajos demuestran el aumento de anomalías cromosómicas en embriones humanos multinucleados, encontrándose altas tasas de mosaicismo y/o poliploidía (ref. 3,4).

Nuestro objetivo es demostrar la influencia de la multinucleación en las tasas de implantación y de aborto en un programa de fecundación in vitro.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se presentan un total de 820 casos de ciclos de FIV/ICSI en los que se transfieren dos embriones en día +3 en cada uno de ellos. Los casos son divididos en tres grupos distintos, Grupo A: (n = 699) transferencia de dos embriones sin multinucleación, Grupo B (n = 94) transferencia de 1 embrión multinucleado (+2 ó +3) y 1 embrión sin multinucleación, y Grupo C (n = 27) transferencia de dos embriones con multinucleación (+2 ó +3).

Determinaremos los porcentajes en las tasas de embarazo, tasa de aborto, tasas de implantación y las tasas de

implantación evolutiva en cada uno de los grupos, analizando las variaciones entre ellos mediante el test estadístico de Chi-cuadrado.

RESULTADOS:

	Grupo A	Grupo B	Grupo C
Nº casos	699	94	27
Nº embarazos	386	40	11
Tasa embarazo %	55.22	42.55	40.74
Nº abortos	43	10	2
Tasa aborto %	11.14	25.00*	18.18
Tasa de implantación %	31.40	17.64*	15.78**
Tasa de implantación evolutiva %	27.00	14.03*	14.03**

* Diferencias estadísticamente significativas entre grupo A y B.

** Diferencias estadísticamente significativas entre grupo A y C.

Los resultados demuestran la influencia de la multinucleación en las tasas de implantación y de aborto. Se observa una bajada estadísticamente significativa en las tasas de implantación (31.4%, 17.64%, 15.78%), tasa de implantación evolutiva (27.0%, 14.03%, 14.3%) y un aumento en las tasas de aborto (11.14%, 25.0%, 18.18%) entre el grupo A y los grupos B y C respectivamente.

CONCLUSIONES:

Los resultados nos demuestran que la presencia de blastómeras multinucleadas está asociada con un desarrollo embrionario comprometido en los ciclos de FIV, lo que supone una bajada en las tasas de implantación y en la tasa de formación de blastocisto, y un aumento en las tasas de aborto. Esto nos indica que debemos evitar la transferencia de embriones multinucleados siempre que sea posible. Pero que en los casos donde solo

tengamos embriones multinucleados aptos para transferencia podemos intentar la transferencia ya que son embriones capaces de conseguir embarazos evolutivos.

009: RESULTADO ACUMULADO TRAS LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES RE-VITRIFICADOS EN CICLOS DE DONACIÓN DE OVOCITOS DE BANCO.

A. Mifsud, D. Castelló, N. Grau, M. Meseguer, J. M. de los Santos, A. C. Cobo
Instituto Universitario IVI, Valencia

INTRODUCCIÓN:

La técnica de vitrificación de ovocitos ofrece resultados muy satisfactorios, lo que ha hecho posible el establecimiento de bancos de ovocitos de donante. La disponibilidad de ovocitos almacenados en dichos bancos simplifica considerablemente el mecanismo de la donación haciendo de ésta, un proceso más fácil y rápido. Dado el rendimiento de los ovocitos vitrificados-desvitrificados, es frecuente contar con embriones adicionales aptos para ser criopreservados tras la transferencia (re-vitrificación de embriones). El objetivo de este trabajo es evaluar la tasa de gestación acumulada tras la transferencia de embriones re-vitrificados en un programa de ovodonación utilizando ovocitos vitrificados de banco.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Este estudio incluye un total de 505 ciclos donación de ovocitos vitrificados (media de edad= $26,6 \pm 3,8$ y $41,2 \pm 4,5$ para las donantes y las receptoras respectivamente). Se donaron un total de 5.287 ovocitos. La re-vitrificación de embriones adicionales tras la transferencia se realizó en 294 ciclos (58,2%), 102 de los cuales han sido desvitrificados hasta el momento. Se ha calculado la tasa acumulada de gestación (tasa de gestación tras la primera transferencia mas la tasa de gestación tras la transferencia de embriones re-vitrificados). El método utilizado en la vitrificación tanto de ovocitos como de embriones fue el descrito por Kuwayama et al. utilizando el Cryotop® como dispositivo de carga.

RESULTADOS:

El 92,9% de los ovocitos sobrevivieron tras la vitrificación. Se realizaron 452 (89,5%) transferencias con una media

de embriones transferidos de $1,9 \pm 0,7$. La tasa de gestación por transferencia y la tasa de gestación evolutiva fueron de 56,9% y 41,2% respectivamente. De los 102 ciclos de desvitrificación de embriones 99 finalizaron en transferencia embrionaria (97%). La tasa de supervivencia embrionaria fue del 96,3%. Se han transferido 186 embriones re-vitrificados (media $1,6 \pm 0,6$). La tasa de gestación por transferencia de embriones re-vitrificados y la tasa de gestación evolutiva fue de 45,1% y 31,1% respectivamente. Adicionalmente, las tasas de gestación acumulada y acumulada evolutiva fueron de un 72,6% y 59,9% respectivamente. Hasta el momento han nacido 87 niños.

CONCLUSIONES:

La re-vitrificación de los embriones adicionales procedentes de los ciclos de donación de ovocitos vitrificados no afecta su capacidad para implantar y conseguir gestaciones viables, lo que permite mejorar el rendimiento total del ciclo, contribuyendo a incrementar el éxito de las donaciones realizadas con ovocitos de banco.

010: CONGELACIÓN LENTA VS. VITRIFICACIÓN CON CRYOTOP EN DÍA 3 DE DESARROLLO Y ESTADIO DE BLASTOCISTO. RESULTADOS DEL 2008 EN EL IVI MADRID.

L. Herrero, S. Pareja, C. Losada, M. Jiménez, J. Fernández, Y. Mínguez.
IVI, Madrid

INTRODUCCIÓN:

La criopreservación de embriones en el laboratorio es una técnica de gran importancia que permite rentabilizar al máximo los ciclos de FIV de nuestras pacientes. En el año 2007 hemos introducido en el laboratorio la Vitrificación como método de criopreservación de embriones, y gracias a ella hemos logrado mejorar nuestro programa de criopreservación aportándole eficacia y estabilidad.

El objetivo de este trabajo es mostrar los resultados de nuestro programa de descongelación y transferencia de embriones congelados, comparando la vitrificación y la congelación lenta de embriones en diferentes estadios de desarrollo.

MATERIAL Y MÉTODOS:

En este estudio se muestran los resultados de las descongelaciones de embriones llevadas a cabo durante todo

el año 2008 en IVI Madrid. La congelación-descongelación lenta en día 2 y 3 de desarrollo embrionario se llevó a cabo con medios de Vitrolife (Freeze Kit y Thaw Kit), y en día 5-6 con los medios de COOK (blastocyst freezing kit y thawing kit, Sidney IVF). El congelador que utilizamos fue una Planer (Kryo 360-1.7, Telstar) con una rampa específica para cada estadio de desarrollo. La vitrificación se realizó con el método del Cryotop (Kitazato).

RESULTADOS:

CONCLUSIONES:

La vitrificación resulta ser más la técnica de criopreservación más efectiva independientemente del estadio embrionario. Los embriones en día 2/3 de desarrollo presentan una tasa de supervivencia significativamente mayor en el caso de la vitrificación, reduciéndose también significativamente la tasa de cancelación de transferencias. Lo mismo se observa en los blastocistos

vitrificados: la supervivencia es mayor y por tanto la cancelación es menor. La tasa de gestación e implantación es significativamente mayor en las transferencias de blastocistos desvitrificados.

La eficacia de la vitrificación ha permitido estabilizar los resultados de nuestro programa de criopreservación, reduciendo el número de cancelaciones y aumentando las tasas de gestación e implantación en las pacientes que buscan en estos embriones una segunda oportunidad de embarazo.

	Embriones en día 2 y 3 de desarrollo		Embriones en día 5 y 6 de desarrollo	
	Congelación Lenta	Vitrificación Cryotop	Congelación Lenta	Vitrificación Cryotop
Nº Procedimientos	272	208	25	75
Tasa de Cancelación de transfer (%)	21.3*	7.2*	44*	6.7*
Media de Edad	35.6	35.7	37.4	35.6
Tasa de supervivencia (> 50% de las células)	55.2*	85.8*	25*	78*
Media de Embriones transferidos	1.8	1.8	1.3	1.3
Tasa de Gestación Clínica (%)	34.6	35.2	21.4*	50*
Tasa de Gestación Bioquímica (%)	29.0	31.1	14.3*	42.9*
Tasa de Implantación (%)	19.4	22	10.7*	36.4*
Tasa de Gemelares (%)	17.7*	30*	0*	10*
Tasa de Aborto (%)	8.1	10	0*	10*

P<0.05.

O11: PATRON DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL ENTRE MUESTRAS DE SEMEN QUE CONSIGUEN O NO EMBARAZO CON LA MISMA COHORTE OOCITARIA EN CICLOS DE ICSI CON OVOCITOS DONADOS

S. García-Herrero, N. Garrido, J. A. Martínez-Conejero, A. Pellicer, J. Remohí, M. Meseguer
Instituto Universitario IVI Valencia, Valencia

INTRODUCCIÓN:

El método habitual para la evaluación de la fertilidad masculina es el espermiograma aunque su poder diagnóstico es limitado a la hora de explicar el fracaso en los tratamientos de reproducción asistida sobre todo en aquellos de ICSI, indicado para sémenes con parámetros de concentración, movilidad y/o morfología muy alterados. Sin embargo, a pesar de presentar características patológicas unos logran embarazos y otros no. El espermiograma clásico no analiza factores moleculares que pueden afectar en su potencial fértil como es la presencia de ARN mensajero (ARNm). La existencia de estos mensajeros está bien documentada en el proceso de fecundación y en las primeras divisiones embrionarias hasta la transición materno-cigótica. Las nuevas herramientas de análisis masivo como los microarrays pueden ayudarnos a incrementar el poder diagnóstico del espermiograma y a conocer mejor los genes implicados en la fertilidad masculina.

MATERIAL Y METODOS:

Estudio de casos y controles con 10 muestras de semen. Aplicamos el modelo de donación de ovocitos para estandarizar el factor femenino. Escogimos aquellos casos en los que de una donante se obtenían suficientes ovocitos para dos parejas sometiéndose ambas a un tratamiento de ICSI, tras el cual una de las mismas lograba embarazo y la otra no. Tras recolectar 5 casos, procedimos a hacer 2 microarrays por duplicado con las muestras que lograron embarazo (Grupo E, n=5) frente aquellas que no (Grupo NE n=5). Se extrajo el ARNm por el método del Trizol, se almacenó suspendido en agua DEPC y se conservó a -80°C. Además la

calidad del ARNm fue evaluada con el Agilent Bioanalyzer 2100. El microarray utilizado fue uno de genoma completo con una densidad de 44000 sondas aproximadamente (Agilent Whole Genome Microarray, 4X44, One Color). Un posterior análisis de los datos obtenidos por los microarrays identificó los genes diferencialmente expresados (GDE), es decir aquellos comunes a ambos grupos pero que en uno de ellos estaba sobre expresado como mínimo 2 veces respecto al otro y con una significación estadística menor a 0.05. Posteriormente y con ayuda del Gene Ontology (GO) (<http://www.geneontology.org/>) se analizaron los GDE de ambos grupos para caracterizarlos funcionalmente. El GO nos proporciona una estructuración del conocimiento biológico al que divide en tres dominios (GO terms) procesos biológicos (PB), componentes celulares (CC) o funciones moleculares (FM) estadísticamente afectados (EA).

RESULTADOS:

En el grupo E se identificaron 44 GDE mientras en el NE sólo 5. El análisis con el GO determinó que sólo había PB, CC o FM EA en el grupo E (PB: "respuesta al estrés", "respuesta al estímulo externo", "respuesta a estímulos", "apoptosis" y "muerte celular programada". CC: "región extracelular", "vacuola lítica", "lisosoma", "vacuola" y "citoplasma". FM: "unión al ión Cadmio" y "Unión al ión de cobre"). Ningún GO term estaba EA en el grupo NE.

CONCLUSIONES:

Este trabajo revela que existen diferencias moleculares (a nivel de expresión) y funcionales entre muestras que logran embarazo frente aquellas que no, mediante tratamientos de ICSI y

que pueden ser indicadores de éxito reproductivo. El estudio en ovocitos donados y el hecho de que el semen con el que se realizan los microarrays es una alícuota del que posteriormente se utiliza en el tratamiento dota al modelo de una gran robustez. El análisis funcional de los GDE se lleva a cabo porque los genes por si mismos no tienen un sentido biológico, estos interactúan formando redes más complejas, no se pueden tratar como entes discretos. El presente estudio inicia la aplicación de los microarrays en semen como herramienta diagnóstica y abre nuevas líneas de investigación para conocer el papel de determinados genes en el éxito reproductivo.

012: RELACION ENTRE LA FRAGMENTACIÓN DEL DNA ESPERMÁTICO Y LAS TASAS DE IMPLANTACIÓN, EMBARAZO EVOLUTIVO Y ABORTO EN CICLOS DE FIV.

C. Puche¹, A. Rabanal¹, C. Castelló¹, A. Busquets¹, A. Farreras¹, E. Toro¹, E. Vellilla¹, F. García¹, M. López-Teijón¹, J. G. Álvarez¹, J. G. Álvarez².
¹Instituto Marqués; ²Fundación Leonardo Marqués, Barcelona.

INTRODUCCIÓN:

Como ya se ha demostrado previamente, existe una correlación entre el grado de fragmentación del DNA espermático (DFI) y peores tasas de embarazo en ciclos de fecundación in vitro (FIV). Estudios previos indican que la fragmentación del DNA espermático se produce, en su mayor parte, durante el paso de los espermatozoides por el epidídimo y que, como consecuencia de ello, el DFI es más alto en espermatozoides eyaculados que en testiculares. El objetivo de este estudio fue el de correlacionar las tasas de implantación y embarazo evolutivo en ciclos de FIV con espermatozoides testiculares comparado con espermatozoides eyaculados en pacientes con un DFI en semen patológico.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se evaluaron un total de 194 ciclos de FIV en los que el DFI en semen era patológico. La indicación principal para el estudio de fragmentación de DNA en estas parejas fue fallo repetido de embarazo sin causa aparente. Se determinaron las tasas de implantación y embarazo evolutivo en ciclos con espermatozoides eyaculados (grupo eyaculados) (n=53) comparado con testiculares (grupo TESA-ICSI) (n=141). Se consideró un DFI patológico un valor $\geq 20\%$ medido por TUNEL y citometría de flujo (Sergerie et al., Hum Reprod, 20:3446, 2005). Además se incluyó un grupo control de TESA-ICSI en el que la indicación fue vasectomía previa o bloqueo psicógeno a la hora de producir la muestra de semen (grupo TESA-ICSI control) (n=57) y un grupo control con espermatozoides eyaculados en el que no se había hecho estudio de fragmentación de DNA (grupo control

eyaculados) (n=430). Sólo se incluyeron ciclos con óvulos de donante o con óvulos propios en mujeres normorespondedoras con edades < 35 años. Los pacientes con meiosis o FISH patológico fueron descartados de este estudio. El análisis estadístico se realizó mediante two-tailed test Chi-cuadrado (95% CI).

RESULTADOS:

Los resultados se indican en la Tabla 1. Diferencias en las tasas de implantación y embarazo entre el grupo de eyaculados y TESA-ICSI fueron estadísticamente significativas ($P < 0,04$). Diferencias en las tasas de implantación y embarazo entre los grupos de TESA-ICSI y TESA-ICSI control no fueron estadísticamente significativas ($P = 0,376$), mientras que diferencias entre el grupo control eyaculados y el grupo de TESA-ICSI fueron estadísticamente significativas sólo para las tasas de embarazo ($P = 0,002$).

Tabla 1

Grupos	N	Tasa de implantación	Tasa embarazo/transfcr
Eyaculados	53	11,9%	21,1%
Eyaculados control	430	30,9%	56,4%
TESA-ICSI	141	25,6%	37,4%
TESA-ICSI control	57	28,3%	45,7%

CONCLUSIONES:

Las tasas de implantación y embarazo evolutivo en ciclos de FIV en parejas con un DFI patológico en semen son significativamente más altas cuando se utilizan espermatozoides testiculares que eyaculados. Dado que en la gran mayoría de los casos el DFI en espermatozoides testiculares es normal, esto explicaría estas diferencias en las tasas de implantación y embarazo. El

hecho de que el 89% de los embarazos observados en el grupo de TESA-ICSI se produjeron en el primer ciclo podría estar indicando que la fragmentación del DNA espermático es el factor limitante de la causa de infertilidad en estas parejas.

013: ASOCIACIONES ENTRE METABOLITOS URINARIOS DE FTALATOS [DI(2-ETILHEXIL) FTALATO (DEHP)] Y NIVELES DE HORMONAS REPRODUCTIVAS EN VARONES FÉRTILES

J. Mendiola^{1, 2}, N. Jørgensen³, A. M. Andersson³, F. Liu¹, S. H. Swan¹

¹Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine and Dentistry, University of Rochester Medical Center, New York, USA. ²Grupo de Investigación en Salud Pública y Epidemiología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, España. ³University Department of Growth and Reproduction, Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark.

INTRODUCCIÓN:

Existen cada vez más estudios científicos que relacionan las exposiciones ambientales a compuestos disruptores endocrinos (DE) con el riesgo de efectos adversos para la salud reproductiva humana. Ciertas sustancias químicas, como los ftalatos, pueden producir alteraciones hormonales a través de diversos mecanismos moleculares y celulares. Varios trabajos recientes sugieren una asociación entre la disminución de la concentración de Testosterona masculina y el incremento de las exposiciones a distintos DE. Estudios experimentales y observacionales han mostrado una actividad antiandrogénica de estos compuestos ftalatos. Sin embargo, todavía existe un conocimiento limitado acerca de la relación entre estas sustancias químicas y los niveles de hormonas sexuales en varones fértiles.

MATERIAL Y METODOS:

Todos los sujetos que se incluyeron en este trabajo participaron en el estudio multicéntrico denominado "Study for Future Families" y fueron reclutados entre las parejas de mujeres embarazadas que acudían a clínicas prenatales afiliadas a hospitales universitarios de 5 estados norteamericanos entre los años 1999 y 2005. A los varones que aceptaron participar en el estudio se les realizó un cuestionario general epidemiológico, exploración andrológica, extracción sanguínea y recogida de muestra de orina. Los metabolitos urinarios de DEHP, a saber: Mono(2-etilhexil) ftalato (MEHP), Mono(2-etil-5-hidroxihexil) ftalato (MEHHP), Mono(2-etil-5-oxohexil) ftalato (MEOHP) y Mono(2-etil-5-carboxipentil) ftalato (MECPP)

fueron analizados en el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta (Georgia, USA). Las hormonas FSH, LH, Testosterona, Inhibina B, Estradiol y SHBG fueron analizadas, o calculadas [Testosterona libre e Índice de Andrógenos Libres (FAI)] en el Departamento de Crecimiento y Reproducción del Rigshospitalet (Copenhague, Dinamarca). Los análisis estadísticos de datos crudos (no ajustados) incluyeron pruebas paramétricas y coeficientes de correlación de Pearson. Posteriormente, se utilizaron modelos de regresión multivariante para el ajuste por posibles factores de confusión, que en nuestro caso incluyeron: edad, Índice de Masa Corporal (IMC), tabaquismo, niveles de creatinina plasmática, tiempo de extracción sanguínea y grupo étnico. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS 17.0.

RESULTADOS:

El número final de individuos estudiados fue de 425 varones. La media y desviación estándar de la edad e IMC fue de 32.2 (6.2) años y 28.2 (5.40) respectivamente. El 21% de los varones era fumador y el 72% de raza blanca. En los análisis crudos se observó una correlación inversa estadísticamente significativa entre los niveles de Testosterona y la concentración de metabolitos urinarios MEOHP ($r = -0.10$, p -valor <0.05) y MECPP ($r = -0.10$, p -valor <0.05) respectivamente. Además, también se observó una correlación negativa estadísticamente significativa entre los niveles de Testosterona libre y la concentración de metabolitos urinarios MEHP ($r = -0.15$, p -valor <0.01), MEHHP ($r = -0.13$, p -valor <0.01), MEOHP ($r = -0.14$, p -valor <0.01) y MECPP ($r = -0.13$, p -

valor <0.01) respectivamente. Los niveles de FAI mostraron una correlación inversa significativa con los metabolitos MEHP ($r = -0.23$, p -valor <0.01), MEHHP ($r = -0.14$, p -valor <0.01), MEOHP ($r = -0.15$, p -valor <0.01) y MECPP ($r = -0.12$, p -valor <0.05) respectivamente. Tras el ajuste por los posibles factores de confusión, los niveles de FAI presentaron una asociación inversa estadísticamente significativa con los metabolitos urinarios MEHP ($\beta = -0.05$; IC 95%, -0.08 , -0.02), MEHHP ($\beta = -0.04$; IC 95%, -0.07 , -0.004) y MEOHP ($\beta = -0.04$; IC 95%, -0.07 , -0.01) respectivamente.

CONCLUSIONES:

Nuestros resultados sugieren que los metabolitos urinarios de DEHP podrían estar asociados con la alteración de las hormonas sexuales circulantes, principalmente FAI, en varones fértiles. Estos resultados son consistentes con trabajos experimentales previos y señalan la importancia de ahondar en el estudio de estos DE para conocer con mayor certeza sus implicaciones clínicas en relación con la salud reproductiva humana.

014: EFECTO DEL TABACO SOBRE LA OXIDACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO Y SU DEFENSA CONTRA EL ESTRÉS OXIDATIVO

T. Viloría, M. Meseguer, J. A. Martínez-Conejero, P. Romero, J. Remohí, N. Garrido
IVI, Valencia

INTRODUCCIÓN:

Existe información controvertida sobre los efectos del tabaco en la fertilidad masculina y la calidad espermática. Nuestro grupo ha evaluado el efecto del tabaco sobre la integridad del ADN, produciendo en los pacientes fumadores elevados niveles de fragmentación del mismo.

El objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos indirectos del consumo del tabaco sobre la defensa oxidativa del espermatozoide formada por el sistema del glutatión y los efectos directos sobre el ADN consecuencia del exceso de radicales libres producidos por el tabaco.

MATERIAL Y METODOS:

Realizamos un estudio experimental doble ciego en un total de 117 muestras

se midió individualmente en cada espermatozoide mediante citometría de flujo (Coulter Cytometry, Hialeah, FL). En cada tipo de estudio se establecieron dos grupos en función del consumo o no de tabaco. Se utilizó el test de T-Student para detectar diferencias significativas entre los grupos.

RESULTADOS:

Identificamos una disminución significativa en la actividad de la enzima GPx4 (exclusiva de espermatozoides) pero no en la GPx1 ni en la GR de los espermatozoides de varones fumadores. También observamos una disminución significativa en la expresión de GPx1, GPx4 y GR ARNm. En la siguiente tabla presentamos los datos de los niveles de oxidación del ADN espermático de pacientes fumadores y no fumadores. ET= error típico.

Oxidación del ADN	No Fumadores	Fumadores	P
% de celulas oxidadas	41.14 (ET = 2.32)	44.87 (ET=2.54)	0.282
Intensidad de oxidación	240.53 (ET =21.16)	233.92 (ET = 19.99)	0.823

de semen de varones infértiles. Para ello analizamos la actividad enzimática del sistema del glutatión analizando la glutatión peroxidasa (GPx) (sus isoformas 1 y 4), la glutatión reductasa (GR) y el glutatión celular libre (GSH) (n=29). Por otro lado estudiamos el ARNm de GPx1, GPx4 y GR mediante PCR cuantitativa (n=33). Una pequeña porción de los espermatozoides del eyaculado también fue apartada para medir la oxidación del ADN mediante el OXI DNA assay kit (OxiDNA Assay, Calbiochem, Barcelona, España), basado en la unión directa de un anticuerpo fluorescente a la 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) un producto de la oxidación por el ataque de los radicales libres (n=55). La fluorescencia

Los datos muestran pequeñas diferencias que carecen de significancia.

CONCLUSIONES:

De nuestros datos podemos deducir que el tabaco está afectando negativamente a los enzimas antioxidantes de origen intracelular presentes en los espermatozoides pero esto no afecta a la integridad del ADN en lo que hace referencia a su oxidación y por lo tanto no lo podemos considerar como el origen de la fragmentación del ADN. Por consiguiente los efectos del tabaco reduciendo la defensa contra los radicales libres están aun por determinar.

O15: LA MET-ENCEFALINA SE EXPRESA EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS Y REGULA LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA POR VÍA DE LOS RECEPTORES OPIOIDES.

N. Subirán^{1, 2}, M L. Candenás², E. Agirregoitia¹, F. M. Pinto², J. L de Pablo³, C. G. Ravina⁴, J. Irazusta¹.

¹ Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina y Odontología. UPV/EHU. Leioa, Bizkaia. ² Laboratorio de Farmacología. Instituto de Investigaciones Químicas, CSIC-Universidad de Sevilla. Sevilla. ³ Laboratorio FIV. Clínica de Reproducción Asistida Quirón. Bilbao, Bizkaia.

⁴ Laboratorio de Andrología. Instituto Valenciano de Infertilidad, Fundación IVI. Sevilla.

INTRODUCCIÓN:

La met-enkefalina, que se genera por hidrólisis de su precursor proteico pro-enkefalina (PENK), es uno de los péptidos bioactivos mejor conocidos del sistema opioide y su acción es inactivada mediante degradación enzimática (1). La met-enkefalina está presente en distintos órganos y tejidos del aparato reproductor tanto masculino como femenino (2) sugiriendo que los espermatozoides podrían estar expuestos a dicha sustancia en su tránsito hasta producirse la fecundación. La presencia de los receptores opioides (μ , δ , κ) en espermatozoides humanos (3), indica además que la met-enkefalina podría regular la función reproductora ejerciendo una acción directa sobre los espermatozoides. Por lo tanto, nuestro objetivo fue analizar la expresión y localización de PENK y de la met-enkefalina en espermatozoides humano y determinar su implicación en la movilidad espermática.

MATERIAL Y MÉTODOS:

La expresión y localización de la PENK y de la met-enkefalina se determinó por RT-PCR e inmunocitoquímica en espermatozoides capacitados aislados mediante gradiente de Percoll. La movilidad espermática se determinó mediante el sistema CASA tras la incubación de los espermatozoides capacitados con met-enkefalina exógena, y con inhibidores del metabolismo de encefalinas y naloxona (antagonista de los receptores opioides).

RESULTADOS:

El mRNA del precursor PENK está presente en espermatozoides

capacitados y su proteína se localiza en la región ecuatorial post-acrosomal del espermatozoide. La met-enkefalina se localiza en la región acrosómica aunque en un 10% de los espermatozoides analizados no se observa inmunoreactividad. La adición de met-enkefalina exógena produce un rápido aumento dosis-dependiente de la movilidad espermática, seguido de un rápido descenso a los 30 min. de incubación. Sin embargo, a las tres horas se produce una mejora de la movilidad espermática. La inhibición de las enzimas-degradadoras de encefalinas (en ausencia de encefalinas exógenas) mejora la movilidad espermática, efecto que es revertido en presencia de naloxona en el medio, lo que indica que dicha acción se produce a través de una vía que implica los receptores opioides.

CONCLUSIONES:

La movilidad espermática es regulada paracrinamente por la met-enkefalina mediante la acción de encefalinas presentes a lo largo del aparato reproductor femenino. La inhibición de la degradación de encefalinas (en ausencia de encefalinas exógenas) mejora la movilidad espermática a través de una vía que implica los receptores opioides, presumiblemente mediante una acción autocrina de la met-enkefalina endógena que se acumula en la región acrosómica de los espermatozoides.

1. Subirán N, Agirregoitia E, Valdivia A, Ochoa C, Casis L, Irazusta J. Expression of enkephalin-degrading enzymes in human semen and implications for sperm motility. *Fertil Steril*. 2008 May;89(5 Suppl):1571-7.

2. Fabbri A, Jannini EA, Gnassi L, Ulisse S, Moretti C, Isidori A. Neuroendocrine control

of male reproductive function. The opioid system as a model of control at multiple sites. *J Steroid Biochem*. 1989 Jan;32(1B):145-50. Review.

3. Agirregoitia E, Valdivia A, Carracedo A, Casis L, Gil J, Subirán N, Ochoa C, Irazusta J. Expression and localization of delta-, kappa-, and mu-opioid receptors in human spermatozoa and implications for sperm motility. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Dec;91(12):4969-75.

AGRADECIMIENTOS:

Trabajo financiado por el MEC (BFU2006-07779), la Diputación Foral de Bizkaia (7/12/EK/2006/61) y la Junta de Andalucía (P08-CVI-04185). N.Subirán posee una Ayuda de Formación del Personal Investigador de la UPV/EHU

016: VALIDACION DE UN NUEVO SISTEMA AUTOMATICO PARA EL ESTUDIO DE ANEUPLOIDÍAS EN ESPERMATOZOIDES.

S. Santillán¹, X. Vendrell¹, E. García-Mengual¹, M. Pérez Alonso^{1, 2}.

¹Laboratorio de Citogenética Molecular. Unidad de Genética Reproductiva. Sistemas Genómicos. ²Departament de Genètica. Facultat de Ciències Biològiques. Universitat de València

INTRODUCCIÓN:

La infertilidad severa del varón está asociada a recombinación meiótica alterada que produce un incremento de aneuploidía en espermatozoides. Su efecto fenotípico se traduce en un aumento de embriones cromosómicamente alterados, disminución de la tasa de embarazos, aumento de abortos, mortinatos o fracasos de tratamientos de reproducción asistida así como en alteraciones en el número, movilidad o morfología de espermatozoides.

El estudio de aneuploidías en espermatozoides a través de hibridación in situ fluorescente (FISH) ha demostrado alteraciones numéricas de la mayoría de cromosomas (1, 8, 6, 10, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X e Y) detectándose entre el 1.5-5.5% en pacientes con trastornos de fertilidad.

Debido a la baja frecuencia de las alteraciones, los sistemas manuales exigen el estudio de un número elevado de espermatozoides hibridados con cada una de las sondas utilizadas. Esto representa mucho tiempo de trabajo y un riesgo de variación inter observadores.

En los últimos años se han desarrollado nuevos sistemas automáticos que incluyen la microscopía motorizada junto a sistemas de segmentación, digitalización de imágenes y análisis con software específico para la clasificación celular, lectura de señales, manipulación y archivo de datos.

El objetivo de este estudio es determinar la precisión y exactitud de un sistema automático para la detección de aneuploidías en muestras de semen de

varones sanos, previa a la utilización de esta tecnología sobre muestras patológicas.

MATERIAL Y MÉTODOS:

El estudio se realizó sobre 10 muestras de semen de varones sanos con fertilidad probada.

Las muestras se procesaron siguiendo protocolos de descondensación, fijación de espermatozoides e hibridación con sondas para los cromosomas 13, 21, 18, X e Y (AneuVysion, Abbott). Las sondas fueron sometidas a control de calidad valorando la intensidad de la señal, especificidad, ruido de fondo y porcentaje de hibridación.

El análisis comparativo se realizó sobre 40.000 espermatozoides para el sistema manual y 53.648 espermatozoides para el sistema automático. Los criterios de evaluación de FISH fueron: espermatozoides con bordes bien definidos y sin solapamientos, tamaño e intensidad de la señales similares, posición de la señal dentro del núcleo, distancia relativa entre dos señales así como los criterios citados en el control de calidad. Se valoró disomía y nulismía para cada uno de los cromosomas.

Además se realizaron controles intraensayo para valorar la reproducibilidad del sistema automático.

El análisis automático se hizo con el sistema Metafer-MetaCyte (MetaSystems, Alemania).

RESULTADOS:

La tasa global de aneuploidías fue: sistema automático: 1.43% ± 0.45; sistema manual: 1.47% ± 0.46.

El análisis de aneuploidías en cada cromosoma revela los siguientes datos para el sistema automático y manual respectivamente: Cromosoma 13: 1.36% ± 0.43 y 1.37% ± 0.62; Cromosoma 21: 1.2% ± 0.51 y 1.22% ± 0.48; Cromosoma 18: 1.22% ± 0.37 y 1.32% ± 0.39; Cromosomas sexuales: 1.93% ± 0.44 y 2% ± 0.39.

CONCLUSIONES:

El estudio de validación realizado demuestra que los resultados obtenidos de forma manual son comparables con los resultados obtenidos de forma automática. Se demuestra que cada cromosoma presenta una frecuencia distinta de aneuploidías. El estudio nos ha permitido establecer el punto de corte para disomías y nulismías en cada cromosoma estudiado.

Sin embargo, la información que aporta es limitada a los cromosomas y regiones estudiadas.

El método automático ha resultado ser un método robusto, rápido, reproducible y capaz de analizar un mayor número de núcleos disminuyendo el tiempo de trabajo.

Sería interesante valorar otras tecnologías que informen sobre todo el complemento cromosómico de los espermatozoides.

017: RELACIÓN ENTRE LAS VACUOLAS NUCLEARES OBSERVADAS POR ALTA MAGNIFICACIÓN EN ESPERMATOZOIDES Y LA FRAGMENTACIÓN DEL DNA ESPERMÁTICO.

M. González, M. Dorado, M. Hebles, B. Migueles, L. Aguilera, F. Sánchez, J. A. Lara, A. Rodríguez, P. Sánchez.
Clínicas GINEMED, Sevilla

INTRODUCCIÓN:

La microscopía convencional nos permite observar los espermatozoides a 400 aumentos, no siendo visibles las vacuolas presentes en algunos espermatozoides.

Con la introducción de la microscopía de alta magnificación es posible observar la morfología de las organelas de los espermatozoides a 6600 aumentos, usando la óptica Nomarski, siendo Clínicas Ginemed pionera en la adquisición del primer microscopio de alta magnificación en España.

Al realizar el test de fragmentación del DNA a los espermatozoides, debemos fijarlos previamente, por lo que no podrían ser ya utilizados, en caso de tener su DNA intacto, para realizar ICSI.

El objetivo de este estudio consiste en comprobar si existe relación entre la presencia de vacuolas nucleares (en elevado número y/o de gran tamaño) y una fragmentación del DNA espermático alterada.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se analizaron 200 espermatozoides de las muestras seminales de 10 pacientes que llegaron de modo consecutivo a nuestro laboratorio. Se les practicó el test de fragmentación del DNA mediante la técnica SCD (Sperm Chromatin Dispersión) con el kit Halosperm, a dichas muestras en fresco y se evaluó la morfología según criterio estricto de Krüger. Además se observaron bajo microscopía de alta magnificación contabilizándose por un lado el porcentaje de espermatozoides sin vacuolas y con 2 ó menos vacuolas pequeñas y por otro el porcentaje de espermatozoides con más de 2 vacuolas pequeñas, una gran vacuola y núcleos aberrantes.

Se analizó mediante el programa estadístico SPSS versión 17, en cada una de las muestras, en primer lugar, la relación existente entre el porcentaje de espermatozoides que presentaban más de 2 vacuolas pequeñas, una gran vacuola y núcleos aberrantes con la fragmentación del DNA, y en segundo lugar con la fragmentación del DNA más la morfología espermática.

RESULTADOS:

En la comparación del porcentaje de espermatozoides que presentaban más de 2 vacuolas pequeñas, una gran vacuola y núcleos aberrantes con la fragmentación del DNA, se obtuvo un ajuste a la recta de mínimos cuadrados de un 44,6%. Si además de la fragmentación del DNA tenemos en cuenta también la morfología espermática el ajuste obtenido fue de un 46,7%.

Existe, por tanto, una relación lineal entre el porcentaje de espermatozoides con más de 2 vacuolas pequeñas, una gran vacuola y núcleos aberrantes con una elevada tasa de fragmentación del DNA espermático. La morfología espermática nos permite hacer un mejor ajuste, aunque por si sola no sería concluyente.

CONCLUSIONES:

La selección de espermatozoides sin vacuolas o con 2 ó menos vacuolas pequeñas mediante microscopía de alta magnificación es una herramienta muy útil que nos permitirá elegir aquellos que no tengan su DNA fragmentado con una alta probabilidad, mejorando así los resultados de los ciclos de reproducción asistida, sobre todo en aquellos pacientes cuyas muestras seminales presentan una tasa de fragmentación del DNA elevada.

018: BLASTOCISTOS VITRIFICADOS PROCEDENTES DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL (DGP) COMO FUENTE PARA LA DERIVACIÓN DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS (CME)

M. Solé, B. Aran, M. Parriego, I. Rodríguez-Pizà, J. Santaló, M. Boada, B. Coroleu, A. Veiga.
Institut Universitari Dexeus y Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona

INTRODUCCIÓN:

En el laboratorio de Fecundación in vitro del Institut Universitari Dexeus la criopreservación en los ciclos de DGP se realiza en estado de blastocisto y desde el año 2004 se incorporó de forma rutinaria la técnica de vitrificación.

Los embriones diagnosticados como anormales o sin diagnóstico concluyente son también vitrificados y son donados por las parejas a través de consentimiento informado para ser incluidos en el proyecto de investigación "Derivación de líneas de células madre embrionarias humanas (CME) a partir de embriones anormales y caracterización in vivo de su pluripotencialidad", en colaboración con el Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMRB).

El objetivo del presente estudio es analizar los resultados obtenidos tras la desvitrificación de los blastocistos no aptos para la transferencia en el programa de DGP y su utilidad en la derivación de células madre embrionarias.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Durante el periodo de noviembre-2004 a abril-2005, la vitrificación se realizó mediante la utilización de medios "homemade" y con Hemi-straw insertada en pajuela clásica como soporte (Vanderzwalmen et al., 2003; Parriego et al., 2007) lo que evita el contacto directo con el nitrógeno líquido. A partir del año 2005, el método utilizado en nuestro centro siguió basándose en la utilización de un sistema cerrado (HSV, Cryobiosystem) y medios comerciales Irvine Scientific (USA). Tras la desvitrificación, los blastocistos se mantuvieron en cultivo un mínimo de 4 horas para evaluar su supervivencia.

Los blastocistos o grupos celulares supervivientes fueron sembrados durante las 24-72 horas siguientes sobre una monocapa de fibroblastos humanos para la obtención de células madre embrionarias, mediante la metodología descrita anteriormente (Aran et al., 2009).

RESULTADOS:

Se han desvitrificado un total de 103 blastocistos con una tasa de recuperación de 82.5% (85/103). De los 85 embriones recuperados sobrevivieron un total de 60 (70.6%). Se han observado diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la supervivencia en función de la morfología del blastocisto previo a la vitrificación, estableciéndose tres grupos (Blastocisto inicial/expandido, blastocisto hatching y blastocisto hatched), obteniéndose unas tasas de supervivencia del 87.8% (29/33), 68.3% (28/41) y 27.3% (3/11) respectivamente. También se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la supervivencia entre el grupo de medios "homemade" y el método comercial (44.7% versus 91.5%).

Se sembraron un total de 37 blastocistos y 8 grupos celulares a partir de los cuales se obtuvo una línea de CME.

CONCLUSIONES:

Se obtiene una tasa de supervivencia adecuada al utilizar un método de vitrificación mediante sistema cerrado que evita posibles contaminaciones. Este método es de especial interés para la criopreservación de blastocistos procedentes de embriones biopsiados que presentan una mayor vulnerabilidad a la criopreservación. La diferencia obtenida en función del método

utilizado podría ser debida a la curva de aprendizaje que requiere la técnica de vitrificación.

La baja tasa de derivación observada puede ser debida a la utilización de blastocistos de baja calidad, portadores de anomalías cromosómicas en un elevado porcentaje de casos, como ya se ha descrito por diversos autores.

La obtención de líneas de CME afectas de anomalías genéticas derivadas a partir de este tipo de embriones supone una fuente ilimitada de células para el estudio de los mecanismos moleculares de patologías y el desarrollo de posibles terapias celulares.

019: HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA EN CÉLULA ÚNICA (SC CGH): NUEVA HERRAMIENTA PARA EL SCREENING GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL (SGP)

B. Lledó¹, J. A. Ortiz¹, R. Morales¹, R. Bernabeu².

¹Instituto Bernabeu Biotech, ²Instituto Bernabeu, Alicante

INTRODUCCIÓN:

El SGP ofrece ventajas a los pacientes que se someten a técnicas de FIV, ya que evita la transferencia de embriones con aneuploidías letales. El SGP empleando la técnica de FISH presenta una limitación importante ya que sólo 9 cromosomas pueden ser analizados. Esta limitación afecta tanto al diagnóstico, algunos embriones aneuploides son diagnosticados erróneamente ya que tiene aneuploidías para otros cromosomas que no están incluidos en el test, así como a la indicación ya que en determinados casos (fallos de implantación) otros cromosomas podrían estar implicados. Por todo ello, las estrategias que se emplean para la detección de aneuploidías en célula única van encaminadas a incrementar el número de cromosomas a estudiar.

La SC CGH (Hibridación genómica comparada en célula única) es una técnica que permite obtener el cariotipo molecular de una sola célula. El inconveniente principal y limitante de la técnica es el tiempo. Nuestro objetivo consiste en aplicar la técnica MDA (Amplificación por desplazamiento múltiple) para obtener suficientes cantidades de ADN y poder reducir el tiempo de hibridación, que limita la técnica. Consiguiendo obtener el diagnóstico sin necesidad de criopreservar los embriones, de modo que en el mismo ciclo se realizaría la transferencia embrionaria consiguiendo no afectar a la viabilidad y capacidad

implantatoria del embrión.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se emplearon líneas celulares euploides y aneuploides cultivadas. El cultivo celular se empleó para obtener el cariotipo, ADN e individualizar células. Se llevó a cabo la amplificación de todo el genoma (WGA) de las células individualizadas empleando la técnica de MDA. Como resultado del MDA se obtuvo ADN suficiente para amplificar, de la misma célula los polimorfismos de diferentes loci así como realizar la hibridación CGH. Para la reacción de CGH realizamos el marcaje del ADN amplificado de una sola célula en verde y marcamos en rojo el ADN control. La hibridación se realizó a diferentes intervalos de tiempo. Posteriormente, se realizan los lavados estándares y se observa al microscopio de fluorescencia empleando DAPI como contraste. Para la captura de las imágenes emplearemos el software Cytovision.

RESULTADOS:

Empleamos células con aneuploidías que afectaban a los autosomas (trisomías 15, 16, 18 y 21), así como a los cromosomas sexuales. Se amplificó el ADN y mediante el análisis de polimorfismos comprobamos el origen de la célula analizada. Posteriormente mediante el protocolo optimizado de SC CGH analizamos una media de 15 metafases por tipo celular. Capturamos cada fluorocromo de forma independiente e integramos los niveles de fluorescencia. El resultado final se representa junto al

ideograma de cada cromosoma. Pudiendo identificar regiones cromosómicas duplicadas/seleccionadas mediante una variación en el ratio 0.8 – 1.2. Se han evaluado diferentes cantidades de ADN así como tiempos de hibridación. Para las condiciones optimizadas, en todos los casos se pudo establecer el cariotipo celular. Todos los cromosomas estaban bien representados salvo las regiones centroméricas y teloméricas.

CONCLUSIONES:

Mediante la CGH se obtiene una representación de todos los cromosomas pudiendo identificar ganancias o pérdidas. Por tanto, la CGH es una herramienta diagnóstica muy prometedora al poderse aplicar a una sola célula. Ya que permitiría detectar cualquier aneuploidía cromosómica en parejas con riesgo de embriones aneuploides como portadoras de alteraciones cromosómicas estructurales. Mediante la metodología descrita evaluamos la fiabilidad, sensibilidad y limitaciones de este nuevo protocolo de SC CGH para poder estudiar la totalidad de cromosomas en una única célula y para utilizarse esta metodología como alternativa a la FISH en el SGP de embriones. Nuestro siguiente objetivo es aplicar la SC-CGH en SGP y conseguir transferir embriones euploides, incrementando de este modo la capacidad implantatoria del embrión así como disminuir las tasas de aborto.

O20: CORRELACIÓN ENTRE LAS ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS OBSERVADAS EN ESPERMATOZOIDES Y EN EMBRIONES PREIMPLANTATORIOS

L. Rodrigo, V. Peinado, E. Mateu, M. Milán, P. Mir, N. Al-Asmar, M. Gil-Salom, C. Rubio
 Instituto Universitario - Instituto Valenciano de Infertilidad, IVI Valencia

INTRODUCCIÓN:

Numerosos estudios han descrito elevadas tasas de embriones cromosómicamente anormales en parejas con infertilidad masculina severa, con incremento de anomalías numéricas en sus espermatozoides. Con el objetivo de ofrecer un mejor consejo genético a estas parejas, hemos evaluado el efecto de los dos tipos más frecuentes de anomalías cromosómicas en espermatozoides (disomía de cromosomas sexuales y diploidía) en el contenido cromosómico de embriones en día 3 de desarrollo.

MATERIAL Y MÉTODOS:

En este estudio retrospectivo de cohortes, realizado entre Julio de 1999 y Diciembre de 2007, se analizaron los resultados de 73 ciclos de Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) para estudio de aneuploidías en 55 parejas con infertilidad masculina severa y cariotipo normal, en las que un estudio de FISH (Hibridación in situ fluorescente) en espermatozoides previo había revelado un incremento de anomalías cromosómicas numéricas al compararlos con 14 donantes fértiles normozoospermicos. Para valorar el impacto en el embrión de las anomalías observadas en los espermatozoides consideramos dos grupos de estudio:

- Grupo 1: 46 ciclos de DGP en 37 parejas con un incremento únicamente de espermatozoides con disomía para los cromosomas sexuales.

- Grupo 2: 27 ciclos de DGP en 18 parejas con un incremento únicamente de espermatozoides diploides.

Como grupo control de DGP se incluyeron 28 parejas fértiles con cariotipo normal, en las que se realizó DGP por enfermedad ligada al sexo (33 ciclos). La edad de la mujer fue ≤ 37 años en todos los grupos.

Para el estudio de FISH en

espermatozoides, las muestras se fijaron con metanol:ácido acético glacial (3:1), se extendieron en portaobjetos y se realizó una hibridación dual para los cromosomas 13 y 21, y una hibridación triple para los cromosomas 18, X e Y. (Vysis Inc. Downers Grove, IL, USA). Para el DGP, se realizó biopsia en el día 3 de desarrollo. Los núcleos se fijaron utilizando el método de Tarkowski modificado y se analizaron los cromosomas 13, 16, 18, 21, 22, X e Y en dos rondas de hibridación consecutivas (Vysis Inc.). Se realizó Chi-cuadrado y test exacto de Fisher con la corrección de Bonferroni, considerando estadísticamente significativos valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS:

Tabla 1. Correlación de anomalías cromosómicas en espermatozoides y embriones.

	GRUPO 1		GRUPO 2		CONTROLES	
	SPZ	EMB	SPZ	EMB	SPZ	EMB
Nº spz/cmb analizados	126178	226	96422	136	120532	200
Nº muestras SPZ/ciclos	37	46	18	27	14	33
% Embriones anormales	--	62,4*	--	58,8*	--	34,0
% Embriones mosaico	--	41,8*	--	29,9*	--	7,4
% Anomalías cr. 13 *	0,08	16,2*	0,10	12,1	0,10	5,2
% Anomalías cr. 16	--	23,4*	--	19,9*	--	8,6
% Anomalías cr. 18	0,04	18,1*	0,03	11,2	0,10	7,1
% Anomalías cr. 21	0,20	21,9*	0,14	12,8	0,38	9,7
% Anomalías cr. 22	--	21,7*	--	17,9*	--	7,5
% Anomalías cr. X c Y	0,89*	20,6*	0,35	10,4	0,37	7,5
% Poliploidías **	0,10	0,9	0,64*	3,7*	0,25	0

Notas: SPZ= espermatozoides; EMB= embriones; *Hace referencia a disomía en espermatozoides y a aneuploidía en embriones; ** Hace referencia a diploidía en espermatozoides y a triploidía en embriones; ^a $p < 0,05$ comparado con los grupos control de espermatozoides o embriones.

CONCLUSIONES:

Un incremento de disomías sexuales y diploidías en los espermatozoides se refleja en una elevada producción de embriones cromosómicamente

anormales. Sin embargo, el tipo de alteraciones que se observan en los embriones difiere según las anomalías detectadas en los espermatozoides:

los varones con espermatozoides con disomía para los cromosomas sexuales producen mayoritariamente embriones aneuploides, así como una elevada incidencia de embriones potencialmente viables con anomalías sólo para los cromosomas sexuales.

los varones con espermatozoides diploides tienen un incremento de embriones triploides, alteraciones no viables relacionadas con abortos.

Por tanto, los estudios de FISH en espermatozoides pueden resultar de utilidad para ofrecer asesoramiento reproductivo más personalizado en parejas con infertilidad masculina severa.

	GRUPO 1		GRUPO 2		CONTROLES	
	SPZ	EMB	SPZ	EMB	SPZ	EMB
Nº spz/cmb analizados	126178	226	96422	136	120532	200
Nº muestras SPZ/ciclos	37	46	18	27	14	33
% Embriones anormales	--	62,4*	--	58,8*	--	34,0
% Embriones mosaico	--	41,8*	--	29,9*	--	7,4
% Anomalías cr. 13 *	0,08	16,2*	0,10	12,1	0,10	5,2
% Anomalías cr. 16	--	23,4*	--	19,9*	--	8,6
% Anomalías cr. 18	0,04	18,1*	0,03	11,2	0,10	7,1
% Anomalías cr. 21	0,20	21,9*	0,14	12,8	0,38	9,7
% Anomalías cr. 22	--	21,7*	--	17,9*	--	7,5
% Anomalías cr. X c Y	0,89*	20,6*	0,35	10,4	0,37	7,5
% Poliploidías **	0,10	0,9	0,64*	3,7*	0,25	0

Tabla 2. Embriones con anomalías cromosómicas potencialmente viables.

^{a-b} $p < 0,05$

021: ESTUDIO DE EMBRIONES CROMOSÓMICAMENTE ALTERADOS PROCEDENTES DE CICLOS DE FIV-DGPI Y SU RELACIÓN CON EL TIPO DE ANOMALÍA MEIÓTICA

A. Colomar^{1, 3}, S. Fernández^{1, 3}, E. Toro^{1, 3}, O. Serra¹, F. Del Río⁴, G. López⁴, M. Brassesco⁴, J. G. Álvarez², M. López-Teijón^{1, 2}, E. Vellilla^{1, 3}
¹Institut Marquès, Barcelona; ²Fundación Leonardo Marquès, Barcelona; ³Centro de Medicina Embrionaria, Barcelona, Madrid; ⁴CIRH, Barcelona

INTRODUCCIÓN:

Las anomalías durante el proceso de meiosis pueden producir gametos aneuploides. La meiosis masculina puede estudiarse mediante análisis citogenético de células germinales obtenidas por biopsia testicular. Cuando la segregación meiótica no es normal, los espermatozoides derivados de ésta pueden producir embriones aneuploides. De ahí que se recomiende llevar a cabo un ciclo de FIV-DGPI con el fin de seleccionar embriones euploides para la transferencia. Actualmente existe escasa información que relacione alteraciones específicas en la meiosis con anomalías cromosómicas en los embriones. El objetivo de este estudio fue determinar la relación existente entre las anomalías cromosómicas encontradas al realizar DGPI y el tipo de alteración meiótica observada para poder proporcionar un consejo genético adecuado a estas parejas.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se incluyeron un total de 168 parejas en las que se realiza un ciclo de FIV/FIV-DO - DGPI por meiosis alterada. Las alteraciones meióticas se clasificaron en tres grupos en función del tipo de anomalía: Desinapsis de Bivalentes (DB); Mosaicismo (M) (existencia de dos líneas germinales una normal y una alterada); y otras alteraciones (O). Los embriones procedentes de estas parejas fueron

biopsiados en día 3 y se realizó un estudio mediante FISH para 9 cromosomas: X, Y, 13, 15, 16, 17, 18, 21, y 22. El análisis estadístico utilizado fue el Test de Igualdad de Proporciones, siendo estadísticamente significativo cuando $p < 0.05$

RESULTADOS:

De las 168 muestras de biopsia testicular diagnosticadas como meiosis alterada se obtuvo la siguiente distribución: 78 muestras tenían DB, 52 M y 38 O. La tasa de embriones aneuploides fue del 46,2% en el grupo DB, 32,7% en M y 21,1% en el grupo O. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos. Con relación al porcentaje de embriones anormales y al tipo de anomalía meiótica observada tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas. La

tabla 1 resume los resultados del DGPI para cada grupo de alteraciones meióticas.

CONCLUSIONES:

Los resultados de este estudio muestran que (i) las anomalías sinápticas durante la meiosis dan lugar a un considerable porcentaje de embriones cromosómicamente anormales; y (ii) el pronóstico en estos pacientes no depende del tipo de alteración meiótica encontrada y, por lo tanto, el consejo genético es independiente del tipo de alteración meiótica detectada. Estos resultados subrayan la importancia de realizar un ciclo de FIV-DGPI en parejas con meiosis masculina alterada.

	DB		M		O		p*
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Aneuploidía	118	(40,55)	89	(43,20)	48	(36,09)	0,13
Doble aneuploidía	43	(14,78)	33	(16,02)	18	(13,53)	0,82
Cromosopatías múltiples	108	(37,11)	70	(33,98)	50	(37,59)	0,72
Ilaploide/Poliploide	22	(7,56)	14	(6,8)	17	(12,78)	0,12
Total embriones	291	(100)	206	(100)	133	(100)	

Tabla 1. Anomalías cromosómicas en embriones en día 3 vs. tipo de alteración meiótica.
 * test de igualdad de proporciones ($p < 0.05$)

022: TRANSLOCACIONES ROBERTSONIANAS: ESTUDIO DE SEGREGACIÓN Y EFECTO INTERCROMOSÓMICO EN EMBRIONES PREIMPLANTACIONALES.

A. R. Jiménez-Macedo, L. Rabinad, E. García-Guixé, C. Giménez, M. Sandalinas.
REPROGENETICS SPAIN, Barcelona

INTRODUCCIÓN:

Las translocaciones Robertsonianas (TROB) son una de las reorganizaciones cromosómicas más frecuentes en humanos (1,23/1000). Los portadores de reorganizaciones pueden producir gametos desequilibrados y, en consecuencia, tienen un riesgo aumentado de fallos de implantación, abortos espontáneos y descendencia con cromosomopatías. Además, los cromosomas implicados en la reorganización muestran frecuentemente regiones asinápticas durante la meiosis I, lo cual puede interferir con la segregación normal de otros cromosomas, produciendo un efecto intercromosómico (EIC).

Objetivos: 1) estudiar el tipo de segregación en embriones de portadores de TROB analizados mediante Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) según: a) el sexo del portador, b) la edad materna (<38 vs. ≥38 años), c) el grupo al que pertenecen los cromosomas implicados (D, G); y 2) observar si existe efecto intercromosómico (EIC) derivado de la translocación.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se estudiaron 452 embriones procedentes de 88 ciclos de FIV-DGP. La biopsia y fijación de los núcleos se realizó en D+3 de desarrollo embrionario según protocolos estandarizados en nuestro laboratorio. Se realizó hibridación in situ fluorescente (FISH) sobre los núcleos y se estudiaron los cromosomas implicados en la reorganización según cada caso.

Para observar el EIC, se compararon 193 embriones de parejas portadoras de TROB (35 ciclos) con 329 embriones de pacientes control (46 ciclos)

procedentes de parejas fértiles, con cariotipo normal, edad materna < 38 años y que realizaron DGP por enfermedades ligadas al sexo. Se realizó FISH para cromosomas no implicados en la translocación (entre 4 y 8 cromosomas).

Para comparar los datos obtenidos se utilizó el test de Fisher (Graph Pad Instat 3).

RESULTADOS:

No se observaron diferencias significativas en la segregación de los cromosomas implicados en la translocación entre mujeres y hombres portadores; entre mujeres según su edad; ni entre los dos grupos de translocaciones analizadas (D-D y D-G). En general, se observó que las segregaciones alternante y la adyacente son las preferentes, sin existir diferencias significativas entre ellas (40.19% vs. 43.78%, respectivamente).

En relación al estudio de aneuploidías en los casos de TROB, se observó un mayor porcentaje de embriones aneuploides en pacientes portadores de TROB respecto al grupo control (39.90% vs. 21.07%, respectivamente; $p < 0.0001$). Estos resultados podrían explicarse debido al EIC producido por la translocación. El incremento de aneuploidías observado es del 47.27% en embriones derivados de pacientes portadores de TROB.

Se dividieron estos pacientes con EIC según el sexo del portador de la translocación observándose que cuando los varones son los portadores, el número de embriones normales es mayor que cuando lo es la mujer (56.31 vs. 38.82%, respectivamente; $p = 0.0194$). Finalmente, se ha observado que si la translocación sólo implica cromosomas del grupo D, el porcentaje

de embriones euploides (sin EIC) es mayor que si la translocación implica cromosomas de los grupos D con G (59.37 vs. 39.00%, respectivamente; $p = 0.0065$).

CONCLUSIONES:

En este estudio, los pacientes portadores de translocaciones Robertsonianas presentan un 40% de probabilidades de tener embriones normales o equilibrados para los cromosomas involucrados en la translocación. No obstante, se ha observado un incremento del 47% de aneuploidías en estos pacientes respecto a la población control. Los varones portadores de TROB presentan menor porcentaje de aneuploidías que las mujeres. La fusión de cromosomas del grupo D produce menor EIC que la fusión entre cromosomas de los grupos D y G.

Recomendamos a pacientes portadores de TROB realizarse un ciclo de FIV-DGP para la translocación junto con un test de aneuploidías para descartar las anomalías derivadas del EIC.

023: EFECTO DE LA VITRIFICACIÓN CON “CRYOTOP” SOBRE LA CONFIGURACIÓN DEL HUSO MEIÓTICO “IN VIVO”

J. F. Zulategui, M. J. de los Santos, V. García, A. Galán, J. L. Romero, A. C. Cobo
IVI, Valencia

INTRODUCCIÓN:

Se sabe que el huso meiótico es una estructura subcelular muy sensible a las temperaturas inferiores a 35° C. Los procesos de criopreservación, como es la vitrificación, implican la exposición de los ovocitos a temperatura ambiente por un periodo prolongado de tiempo, con el consiguiente efecto sobre la dinámica microtubular del huso. El objetivo de este estudio fue valorar el efecto de los procesos de vitrificación y desvitrificación sobre el huso meiótico, mediante el sistema de visualización con luz polarizada Oosight®.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se han incluido 47 ovocitos procedentes de donantes con edad entre 18-35 años, sanas, con ciclos menstruales normales (21-35 días), con IMC normal (18-28 Kg/m²). El análisis de los husos meióticos se ha realizado mediante microscopía de luz polarizada (Oosight®). Se ha cuantificado la birrefringencia de los mismos previo a la vitrificación (fresco), durante el equilibrio (6min y 12 min), inmediatamente después de la desvitrificación y tras 2 horas de cultivo “in Vitro” a 37°C y con 5,5% de CO₂. Para la vitrificación se empleó el método Cryotop®. De los 47 ovocitos se han desvitrificado

20 ovocitos. Tanto la fase de equilibrio como la de dilución de los crioprotectores, se realizaron a temperatura ambiente. El tratamiento estadístico utilizado fue Unianova para comparar medidas repetidas (variaciones intragrupo), siendo significativo cuando p<0,05; y de análisis de varianza univariante para comparar medias en distribución normal siendo significativo cuando p<0,05.

RESULTADOS:

Las retardancias media, máxima y mínima de los husos meióticos a los 6min y a los 12 min durante el equilibrio, e inmediatamente y a las 2 horas post-desvitrificación fueron:

CONCLUSIONES:

Los ovocitos no pierden los husos meióticos en el equilibrio, durante la vitrificación. La depolimerización de las fibras del huso ocurre en la fase de dilución de los crioprotectores durante la desvitrificación. Tras dos horas de cultivo in vitro, tanto las mediciones de retardancia como la estimación del área que ocupa el huso son similares a las observadas en fresco, indicando que tras el proceso de criopreservación se reconstruye la estructura del huso meiótico mostrando parámetros similares a los observados previo a la vitrificación.

	Birrefringencia máxima (nm)	Birrefringencia mínima (nm)	Birrefringencia media (nm)	Área del huso (µm ²)
Fresco (n=47)	3,24 ^a	0,3	1,94 ^c	110,14 ^c
Equilibrio 6 minutos (n=47)		0,4	2,03 ^c	87,16 ^f
Equilibrio 12 minutos (n=38)		0,4	2,14 ^c	97,07 ^c
Desvitrificados 0 horas (n=18)	1,1 ^b	0,26	0,7 ^d	38,01 ^g
Desvitrificados 2 horas (n=18)		0,45	1,85 ^c	91,82 ^e

Diferentes superíndices indica diferencias significativas

024: EFECTO DEL PROCESO DE VITRIFICACIÓN SOBRE LA ESTRUCTURA DEL HUSO MEIÓTICO Y ORGANIZACIÓN CROMOSÓMICA EN OVOCITOS HUMANOS EN METAFASE II.

C. C. Duque¹, J. Alfonso², R. P. Cervera³, A. Monzó^{1, 2}, V. Montañana^{1, 2}, R. Moreno³, M. Stojkovic³, A. Romeu^{1, 2}.

¹Unidad de Reproducción Humana (Servicio de Ginecología). Hospital Universitario la Fe, Valencia. ²Instituto de Medicina Reproductiva (IMER), Valencia. ³Laboratorio de Reprogramación Celular, Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Valencia.

INTRODUCCIÓN:

La criopreservación de ovocitos permite preservar la fertilidad en pacientes que por diversas etiologías pueden sufrir un fallo ovárico prematuro. Los protocolos de congelación/descongelación conllevan una reducción lenta de la temperatura en el tiempo, resultando en el daño irreversible de estructuras vitales de los ovocitos. Los microtúbulos, que conforman el huso meiótico, y los microfilamentos, localizados en el córtex ovocitario, son muy susceptibles a la temperatura de enfriamiento (chilling) y a la exposición a los crioprotectores. Una alineación cromosómica incorrecta previa a la extrusión del corpúsculo polar puede conducir a una segregación cromosómica alterada, fecundación anómala y/o a una elevada incidencia de aneuploidías. La técnica de vitrificación combina tasas de enfriamiento ultrarrápidas (23.000°C/min) y concentraciones elevadas de crioprotectores, aumentando la supervivencia ovocitaria y la integridad de sus estructuras vitales. El objetivo fue evaluar el efecto de nuestro protocolo de vitrificación sobre la integridad del huso meiótico y la organización cromosómica en ovocitos humanos metafase II.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se vitrificaron un total de 12 ovocitos procedentes de pacientes incluidas en el Programa de Fecundación in vitro del Instituto de Medicina Reproductiva (IMER) de Valencia que firmaron el correspondiente consentimiento informado. Como grupo control (ovocitos no vitrificados), se incluyeron 6 ovocitos procedentes de pacientes incluidas en el Programa de Fecundación in vitro de la Unidad de Reproducción del HU La Fe de Valencia, previa firma del

consentimiento de participación en un Proyecto de Investigación desarrollado en el Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia (CIPF).

Para los procesos de vitrificación/desvitrificación se empleó el protocolo descrito por Kuwayama y cols. (2005), comercializado por Irvine Scientific (Vit Kit®-Freeze/Thaw) con el CryoTip® como contenedor. Tras la desvitrificación se evaluaron la tasa de supervivencia y apariencia morfológica tras 4 horas de cultivo in vitro, valorada como integridad de la membrana plasmática y aspecto del ooplasma. Posteriormente, se realizó tinción inmunocitoquímica del huso meiótico siguiendo el protocolo descrito por Lin y cols., 2008, y se visualizaron por microscopía confocal (Servicio de Microscopía Confocal, CIPF).

RESULTADOS:

Se vitrificaron/desvitrificaron un total de 12 ovocitos metafase II. La tasa de supervivencia fue del 91,6% (11/12). Los que sobrevivieron mostraron una apariencia morfológica normal tras 4 horas de cultivo in vitro. Se fijaron un total de 10 ovocitos metafase II desvitrificados y 6 ovocitos metafase II no vitrificados (grupo control). Se consideró una configuración normal del huso meiótico a (1) una estructura en forma de barril, con polos ligeramente señalados y cromosomas formando un grupo ordenado en el ecuador (placa metafásica) cuando el complejo huso/cromosomas estaba orientado paralelo al plano focal o a (2) una estructura circular si el complejo estaba orientado perpendicular al plano focal. La configuración anómala del huso meiótico quedó representada por una desorganización parcial o completa de los microtúbulos. Se consideró una

configuración cromosómica normal cuando los cromosomas se mostraron organizados en el ecuador del barril (placa metafásica) o en un círculo dependiendo del plano focal, y anormal cuando se observó dispersión cromosómica o apariencia cromosómica aberrante o poco condensada (Vanhouette y cols., 2007). El porcentaje de ovocitos informativos fue del 100% para el grupo control (6/6) y del 70% (7/10) para los desvitrificados. La proporción de ovocitos con una configuración del huso meiótico normal y una alineación correcta de los cromosomas fue del 100% (6/6) para ovocitos no vitrificados (grupo control) y del 85,7% (6/7) para ovocitos desvitrificados, resultados similares a los descritos en la bibliografía.

CONCLUSIONES:

La vitrificación de ovocitos, utilizando los contenedores cerrados CryoTip®, es una técnica eficaz, rápida y segura en cuanto que mantiene la integridad del huso meiótico, de la placa metafásica y del anillo de microfilamentos tras su criopreservación.

025: ESTUDIO MEDIANTE EMBRYOSCOPE DE LA MADURACIÓN NUCLEAR DE OOCITOS VG RECUPERADOS DE CICLO ESTIMULADO. EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO OOCITARIO IN VITRO SOBRE LA COMPETENCIA CITOPASMÁTICA.

N. Grau, L. Escrich, T. Viloria, P. Gamiz, M. Borges, M. J. Escribá
Laboratorio de Embriología Clínica. IU-IVI. IVI Valencia.

INTRODUCCIÓN:

La maduración oocitaria consta de dos periodos: 1) reanudación de la meiosis y progresión a MII; 2) periodo de secuestro en MII hasta la activación.

Determinar el momento exacto en que se expulsa el primer corpúsculo polar (1CP) podría hacerse mediante valoraciones periódicas, lo que probablemente afecta al desarrollo además de ser time-consuming.

Con esta comunicación presentamos los primeros estudios de dinámica de maduración en tiempo real mediante tecnología de análisis de imagen asociadas al cultivo (Embryoscope) para definir el momento exacto en que las VG progresan con la rotura de la envoltura nuclear (GVBD, Germinal vesicle breakdown) y finalmente a MII. También evaluamos el efecto del envejecimiento in vitro de los MII sobre la competencia citoplasmática.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se incubaron 41 VG durante 48hr en 25µl de CCM en placas proporcionadas por BioSense mediante cultivo en el Embryoscope. Se registraron imágenes de cada oocito en 9 planos diferentes cada 15 minutos. El visionado y escrutinio manual de los registros permitió anotar el tiempo real de GVBD y extrusión del 1CP. Los resultados se analizaron con SPSS 17.0.

El efecto del tiempo de maduración e incubación previa a la activación sobre la competencia citoplasmática se estudió sobre 129 MII, obtenidos tras 24hr ó 48hr de cultivo, activándose en dos tiempos (grupo a0: activados inmediatamente -jóvenes- y a1: tras 12-24hr de cultivo -envejecidos-). La

activación consiste en incubar en ionóforo de calcio (A23187; 5mM/L) durante 5 minutos, seguido de 4-5hr en puromicina (10µg/mL). Tras 16-20hr, se evaluó la respuesta de activación mediante presencia pronuclear.

RESULTADOS:

Tras 24hr de maduración, 65.8% de las VG progresa a MII y 7.3% necesita 42.7±2.4hr, observándose una tasa global de maduración nuclear del 73.2%.

	GV(%)	MI(%)	MII(%)
24hr (n 41)	5(12.2) ^b	9(21.5) ^b	27(65.8) ^a
48hr (n=14)	5(35.7)	6(42.9)	3(21.4)
Total	5(12.2)	6(14.6)	30(73.2)

a,b p<0.05

Las imágenes muestran que tras 4.4±4.6 horas, las VG experimentan GVBD y se mantienen secuestrados en MI durante 11.5±5.9hr (VG a MII: 14.9±4.3hr).

	Activados(%)	No Activados(%)
24hr-a ₀ (n=95)	64 (67.4) ^a	31 (32.6)
24hr-a ₁ (n=6)	3 (50) ^{ab}	3 (50)
48hr-a ₀ (n=15)	1 (6.7) ^b	14 (93.3)
48hr-a ₁ (n=13)	9 (69.2) ^a	4 (30.8)

No existen diferencias en las tasas de activación a0 y a1 madurados en las primeras 24hr de cultivo (66.3%; p=0.668). En cambio, la tasa de activación es mayor en a1 que en a0 cuando MII se alcanza tras 48hr de maduración (69.2% vs. 6.7%; p=0.00228).

En los oocitos activados en a0, la tasa de activación es significativamente mayor en los que maduran en las primeras 24hr (67.4% vs 6.7%; p=0.00003). En cambio

los activados en a1, responden igual independientemente del momento de maduración (promedio 67.6%).

CONCLUSIONES:

Extender el periodo de maduración más allá de 24hr no incrementa significativamente las tasas de maduración nuclear (65.7% vs 73.2%).

El Embryoscope permite determinar el momento de reanudación de la meiosis

(GVBD:4.4±4.6hrs), así como el inicio del secuestro meiótico en MII (11.5±5.9hr).

Los oocitos madurados in vitro durante las primeras 24hrs son competentes

citoplasmáticamente (66.3%); los madurados durante las siguientes 24 horas parecen requerir de un periodo de cultivo in vitro adicional al de maduración (envejecimiento) para adquirir una competencia citoplasmática comparable a la de los primeros.

Estudios orientados hacia la dinámica de maduración en tiempo real por Embryoscope permitirán optimizar la competencia oocitaria.

026: METABOLÓMICA DEL LÍQUIDO FOLICULAR PROCEDENTE DE CICLOS NATURALES Y ESTIMULADOS MEDIANTE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ALTA RESOLUCIÓN.

V. García-Laez, E. Piñero-Sagredo, M. J. de los Santos, V. Esteve, B. Celda.

IVI Valencia, CIBER-BBN de la Universitat de Valencia y Dept. Química-Física de la Universitat de Valencia (Valencia).

INTRODUCCIÓN:

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica basada en las propiedades de los núcleos atómicos sometidos a un campo magnético que proporciona un espectro que contiene información estructural y de composición de la materia así como datos cualitativos y cuantitativos. La RMN permite la detección de trastornos metabólicos y una distinción de gran variedad de componentes orgánicos de manera que puede proporcionar los perfiles metabólicos de tejidos y biofluidos como puede ser el líquido folicular.

OBJETIVO:

Determinar diferencias metabólicas en los líquidos foliculares de mujeres sometidas a ciclos de estimulación ovárica convencional (EOC) frente a los ciclos naturales comparando los espectros obtenidos por RMN de alta resolución. Analizar la influencia de las gonadotropinas aportadas en los ciclos de EOC en el metabolismo de la glucosa y la producción de lactato.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se realiza un estudio prospectivo de cohortes emparejado que incluye un total de 84 pacientes sometidas a la aspiración del líquido folicular utilizando únicamente el líquido independiente del primer folículo pre-ovulatorio encontrado. 39 fueron ciclos estimulados y 45 ciclos naturales. La edad media en los dos grupos de estimulación fue de 32 años.

Los espectros de RMN fueron obtenidos principalmente en un espectrómetro Bruker Avanz 600 MHz (14.1T) equipado con una sonda QXI 1H/13C/15N/31P de 5mm a una temperatura de 298 K.

Se realizaron experimentos de RMN monodimensionales con atenuación de la señal del agua, presaturación y experimentos Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) spin-echo que fueron llevados a cabo con un tiempo de echo total de 136ms. CPMG usa las diferentes propiedades de relajación basadas en el tamaño de las moléculas, de este modo, se eliminan las resonancias de las macromoléculas. En este tipo de espectros, sólo las señales de los metabolitos más pequeños o moléculas con grupos muy móviles (T2 largo) pueden ser observadas y la línea base es mejorada.

También se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA). Ninguna diferencia significativa fue observada cuando los espectros fueron analizados a través de la integración de las 200 o 500 bandas o de picos bien separados en los espectros CPMG.

Se estudiaron metabolitos estrechamente conectados entre si como son la glucosa, lactato, acetato, acetoacetato - hidroxibutirato y piruvato y que son importantes en las rutas energéticas del folículo. Las correlaciones entre estos metabolitos fueron analizadas a través de la integración de picos bien separados en los espectros CPMG a TE 136 ms.

RESULTADOS:

Todos los espectros obtenidos, mostraron una resolución y ratio señal/ruido adecuados.

Tanto en los ciclos estimulados como en los naturales una correlación lineal negativa puede ser observada entre lactato y glucosa, acetato y - hidroxibutirato, mientras que la correlación entre la glucosa y el acetato, piruvato y acetoacetato es positiva.

Sin embargo en los ciclos estimulados existe una correlación positiva entre el lactato y piruvato, lo cual indica la existencia predominante de una ruta aeróbica; mientras que en los ciclos naturales existe una correlación negativa, propio de una ruta anaeróbica. Además observamos un aumento de la concentración de LH en el líquido folicular de los ciclos naturales lo cual conlleva a una mayor acumulación de lactato.

CONCLUSIONES:

El análisis de los líquidos foliculares mediante RMN de alta resolución, proporciona un perfil de correlaciones de los metabolitos más importantes en las rutas energéticas, distinto entre los ciclos naturales y estimulados. Las gonadotropinas afectan a la glicólisis de las células de la granulosa del ovocito.

027: RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA TASA DE ANEUPLOIDIAS EN OVOCITOS DE DONANTE TRAS ANALISIS DEL PRIMER Y SEGUNDO CORPÚSCULO POLAR MEDIANTE FISH

E. Velilla^{1, 3}, A. Colomar^{1, 3}, S. Fernández^{1, 3}, E. Toro^{1, 3}, A. Casanovas¹, O. Serra¹, R. Olivares¹, M. López-Teijón^{1, 2}.

¹Institut Marquès, Barcelona; ²Fundación Leonardo Marquès, Barcelona; ³Centro de Medicina Embrionaria, Barcelona, Madrid.

INTRODUCCIÓN:

El estudio de la tasa de aneuploidías en ovocitos es muy importante para optimizar la selección de donantes de óvulos. El screening de aneuploidías mediante FISH en mujeres jóvenes se ha realizado en ovocitos donados por parejas que se someten a tratamientos de infertilidad (Gutiérrez-Mateo et al., 2004; Fragouli et al., 2006); en ovocitos que han madurado in vitro (Gutiérrez-Mateo et al., 2006) o en embriones en día 3 procedentes de programas de donación (Munné et al., 2006). Sin embargo, estos resultados no son representativos de las tasas basales de aneuploidías en óvulos de donantes. El objetivo de este estudio fue analizar la tasa de aneuploidías en ovocitos de donantes tras el análisis del primer y segundo corpúsculo polar mediante FISH con el fin de (i) evaluar la tasa basal de aneuploidías existentes en ovocitos procedentes de mujeres jóvenes y fértiles candidatas a ser donantes de óvulos; y (ii) establecer la importancia de introducir el estudio genético preimplantacional en el screening de las donantes. Hasta la fecha, tan sólo existe una publicación que haya estudiado las anomalías cromosómicas en donantes utilizando la técnica CGH (hibridación genómica comparada) (Keskintepe et al., 2007). Por lo tanto, esta es la primera vez que se realiza un estudio de las tasas de aneuploidías en donantes tras el análisis de los corpúsculos polares mediante FISH.

MATERIAL Y MÉTODOS:

En este estudio se incluyeron un total de 16 ciclos de FIV procedentes del programa de donación de ovocitos de Instituto Marquès. El rango de edad de las donantes fue de entre 20 y 31 años (media de 26,06) y se analizaron un total de 106 ovocitos. Se realizó biopsia

del primer y el segundo corpúsculo polar entre 16 y 18 h después de la microinyección por ICSI y se procedió al análisis mediante la técnica de FISH para los cromosomas 13, 16, 18, 21 y 22 según el protocolo descrito por Verlinsky, 2005.

RESULTADOS: De 85 ovocitos analizados, 25 (29,4%) presentaron alteraciones para alguno de los cromosomas estudiados y 60 (70,6%) resultaron normales. La tasa de ovocitos euploides osciló entre un 20 y un 100% por punción. La tasa de aneuploidías encontrada en ovocitos de donante en este estudio concuerda con la publicada por Keskintepe et al. (2007) para los mismos cromosomas analizados. Debido a la existencia de núcleos incompletos procedentes de corpúsculos polares fragmentados no se pudo obtener un diagnóstico en 21 ovocitos. Tan solo dos donantes tuvieron un elevado número de ovocitos aneuploides mientras que las 14 restantes tuvieron una tasa de ovocitos euploides del 78%.

CONCLUSIONES:

Según estos resultados, el 29,4 % de los ovocitos de donantes son aneuploides y, por lo tanto, debería considerarse la posibilidad de realizar el estudio de corpúsculos polares en los programas de donación de ovocitos. Esto permitiría (i) seleccionar las donantes con el mayor porcentaje de ovocitos euploides y (ii) evitar el uso de ovocitos aneuploides.

028: LOS OVOCITOS HUMANOS EXPRESAN LOS RECEPTORES CANNABINOIDES CB1 Y CB2 Y SU LOCALIZACIÓN VARÍA EN LOS DIFERENTES ESTADOS DE MADURACIÓN OVOCITARIA

L. Peralta*, E. Agirregoitia*, R. Mendoza**, A. Expósito**, R. Matorras**, N. Agirregoitia*

*Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina y Odontología UPV/EHU, Leioa, Bizkaia. **Unidad de Reproducción Humana, Hospital de Cruces UPV/EHU. Barakaldo, Bizkaia.

INTRODUCCIÓN:

El sistema cannabinoide está implicado en la modulación de varias fases del proceso de reproducción (Wang et al., 2006). Hasta la fecha, en los tractos reproductores femenino y masculino sólo se ha descrito la presencia del endocannabinoide anandamida (Schuel et al., 2002), sugiriendo que, tanto el espermatozoide como el ovocito, podrían estar expuestos a esa sustancia en su tránsito hasta producirse la fecundación (Schuel and Burkman, 2005). La idea de la implicación del sistema cannabinoide en la reproducción se ha visto reforzada con la reciente descripción de los receptores de cannabinoides CB1 y CB2 en los espermatozoides humanos (Rossato et al., 2005; Agirregoitia et al., 2009). También es sabido que los cannabinoides ejercen su influencia, vía receptor, en la fase de implantación del embrión (Wang et al., 2006). Sin embargo, poco o nada se sabe del papel de los cannabinoides en la maduración de los gametos femeninos.

OBJETIVO:

El interés del presente trabajo de investigación se centra por una parte, en la detección de los receptores de cannabinoides CB1 y CB2 en ovocitos humanos y por otra, en la localización de dichos receptores en las diferentes fases de maduración ovocitaria: vesícula germinal (GV), metafase I (MI) y metafase II (MII). En este sentido, el propósito de este estudio sería resolver si existe presencia de componentes de este sistema cannabinoide en los gametos femeninos y en caso afirmativo, poder discutir la viabilidad de iniciar una vía de investigación, para conocer la influencia de los cannabinoides en la maduración in vitro de ovocitos humanos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

En el estudio se incluyeron ovocitos de pacientes pertenecientes al programa de reproducción asistida (FIV/ICSI) de la Unidad de Reproducción Humana del Hospital de Cruces. Estas pacientes se sometieron a un protocolo de hiperestimulación folicular controlada. La presencia de los receptores de cannabinoides en los ovocitos se analizó a varios niveles mediante tres técnicas: 1) RT-PCR (para la detección de los mRNA de CB1 y CB2), 2) Inmunoblotting (para la detección de las proteínas de CB1 y CB2) y 3) Inmunocitoquímica (para la localización celular de los receptores CB1 y CB2 en las diferentes fases de maduración del ovocito).

RESULTADOS:

Los resultados de la PCR, el inmunoblot y la inmunocitoquímica dejan en evidencia la existencia de los receptores de cannabinoides CB1 y CB2 en los ovocitos humanos. Por otra parte, la localización de cada receptor varía en las diferentes fases de la maduración ovocitaria. Así, la distribución del receptor CB1 es homogénea en ovocitos en fase MI, mientras que en las fases GV y MII la localización es periférica. Por el contrario, el receptor CB2 aparece distribuido de forma homogénea en ovocitos en fase MII y sin embargo en las fases GV y MI la localización del receptor es periférica.

CONCLUSIONES:

La presencia de los receptores de cannabinoides CB1 y CB2 en ovocitos humanos, confirma la presencia de un componente imprescindible del sistema cannabinoide en ese tipo celular. Además sugiere una posible acción de estas moléculas, vía receptor, en la maduración del gameto, tanto en el

ovario como en el tracto reproductor femenino. Por otra parte, la distinta localización de cada receptor en las diferentes fases de maduración nos indica que cada receptor podría tener un papel diferente en ese proceso y por tanto, cada uno sería necesario en fases diferentes de la maduración. Teniendo todo esto en cuenta, la continuación de este trabajo se debería centrar en comprobar cuál es el papel madurativo que tienen los compuestos cannabinoides in vitro, ya que es posible que pudieran ayudar a una maduración ovocitaria controlada y dirigida en el laboratorio de reproducción humana.

BIBLIOGRAPHY:

- Wang et al. *Endocrine Reviews*. 2006, 27(5):427-448
- Schuel et al. *Chem Phys Lipids*. 2002, 121(1-2):211-27
- Schuel and Burkman. *Biol Reprod*. 2005, 73(6):1078-86.
- Rossato et al. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 90(2):984-91;
- Agirregoitia et al. *Fetil Steril*. 2009. In press.

C O M U N I C A C I O N E S P O S T E R

001: ACUMULACIÓN DE OVOCITOS EN BAJAS RESPONDEDORAS. ¿EXISTE UN BENEFICIO?

D. Castelló, A. Mifsud, A. Galán, C. Albert, A. Tejera, A. Cobo
Institut Universitari IVI-València

INTRODUCCIÓN:

Existe una asociación entre el número de ovocitos fecundables y los resultados globales de FIV. La baja respuesta (BR) a las gonadotropinas frecuentemente resulta en cancelación del ciclo, reducción en la cantidad de embriones disponibles para la transferencia y menor probabilidad de éxito. La posibilidad de acumular ovocitos procedentes de varios ciclos de hiperestimulación ovárica controlada (HOC) mediante la vitrificación, podría contribuir a paliar los efectos del bajo número de ovocitos y/o embriones. El objetivo de este estudio es evaluar el valor de la vitrificación de ovocitos en casos de BR.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio ambispectivo de cohorte, que incluye 135 pacientes BR (≤ 5 ovocitos) con una media de edad de $35,9 \pm 2,9$ años sometidas a 304 ciclos de HOC. Los ovocitos (N=417) provenientes de 172 ciclos fueron vitrificados. Mientras que los 575 ovocitos frescos provenientes de 132 ciclos fueron añadidos a los criopreservados, con el fin de acumular una cohorte mixta (N=992 ovocitos), compuesta por ovocitos vitrificados/desvitrificados y ovocitos frescos resultantes de diferentes ciclos

HOC (grupo 1). La tasa de embarazo en el grupo 1 fue comparada con la tasa de embarazo acumulada en un grupo control formado por 965 pacientes BR (edad media: $36,6 \pm 3,6$) (grupo 2). En este grupo, 60 pacientes (8,6%) se sometieron a un segundo ciclo HOC y 2 a un tercero (0,3%). El resto de pacientes declinaron someterse a un nuevo HOC. En el grupo 2 se calculó la tasa de gestación acumulada tras la realización de estos ciclos en fresco. La vitrificación de ovocitos fue llevada a cabo mediante el método de Cryotop®. Para el análisis estadístico se usó el software de análisis estadístico SPSS 12,0. El test de la t-student de dos colas y el test de 2 fueron usados para comparar valores medios y proporciones respectivamente.

RESULTADOS:

La media de vitrificaciones y ciclos frescos fueron $1,3 \pm 0,5$ y $1,0 \pm 0,2$ respectivamente. Un total de 362 de 417 (86,6%) ovocitos sobrevivieron tras la vitrificación. En el grupo 1 el porcentaje de pacientes sometidas a más de un ciclo de HOC fue del 100% mientras que en el grupo 2 el 9,2% se realizó más de un ciclo de HOC ($p < 0,05$). En el grupo 1 se realizaron el 91,8% de las transferencias mientras que en grupo 2 el 80,9% de las pacientes fueron transferidas ($p < 0,05$).

La media de embriones transferidos fue de $2,0 \pm 0,6$ vs. $1,4 \pm 0,3$ respectivamente ($p < 0,05$). La tasa de gestación para el grupo 1 fue 50,8% mientras que en el grupo 1 tras el 1º ciclo fue de 28,3%; 21,6% para el 2º ciclo. En el 3er ciclo ninguna paciente resultó embarazada. Las tasas de implantación y aborto fueron de 29,6% vs. 24,1% y 12,2% vs. 13,7% respectivamente (NS). La tasa de gestación/ciclo en el grupo 1 (50,8%) fue similar a la tasa acumulada obtenida en el grupo 2 (50,9%) (NS).

CONCLUSIONES:

La tasa de gestación conseguida al construir una cohorte más numerosa de en casos de BR mediante la vitrificación de ovocitos, es similar a la tasa de gestación acumulada obtenida con ciclos consecutivos en fresco. Sin embargo, todas las pacientes que han vitrificado ovocitos han tenido la oportunidad de conseguir un 50,8% de éxito, mientras que en fresco solo el 9,2% tuvieron esta oportunidad, debido al alto porcentaje de abandono del tratamiento o la derivación al programa de ovo-donación. Por otra parte, esta estrategia anima a las pacientes a realizar el tratamiento con sus propios ovocitos antes de desistir o tomar esta otra alternativa.

002: DIFERENCIAS DE GÉNERO: LA SOBREENPRESIÓN DE FOXJ2 SE ASOCIA CON FALLO SEVERO DE ESPERMATOGÉNESIS PERO NO CON FALLO DE FOLICULOGÉNESIS

P. Sánchez-Aparicio¹; R. Ramos²; S. Muñoz²; A. Palomo³; C. Romero⁴; M. Nieto¹; E. R. Hernández¹
FivMadrid¹, UAM¹, Instituto de Ginecología y Reproducción, Drs. Ordás y Palomo³, e Instituto La Cigüeña⁴, Madrid

INTRODUCCIÓN:

FoxJ2 es un factor de transcripción, perteneciente a la familia Fork Head, que actúa como activador de la expresión génica de dos proteínas de

interacción celular, Cx43 y Cad-E. Teniendo en cuenta que los ratones transgénicos de sobreexpresión de Foxj2 presentan espermatogénesis aberrante e infertilidad, nos planteamos estudiar si existe una relación similar entre la

infertilidad humana y la sobreexpresión de FoxJ2. Con este objetivo, analizamos los niveles de expresión de FoxJ2 en pacientes con trastornos de infertilidad sometidos a ART.

MÉTODOS:

En este estudio analizamos los niveles de ARNm de FoxJ2 en células de la granulosa de 35 mujeres sometidas a punción folicular, y en tejido testicular de 20 varones sometidos a TESE. Como control se incluyeron donantes de óvulos y pacientes vasectomizados. Para determinar los niveles de ARNm se utilizaron técnicas de RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

RESULTADOS:

Nuestros resultados indican que FoxJ2 se expresa en todas las muestras analizadas, aunque el número de transcritos varía entre dichas muestras.

En el caso de los varones, los niveles más elevados de FoxJ2 corresponden a pacientes azoospermicos que carecen de espermatozoides en tejido testicular. En el caso de las pacientes femeninas, el nivel de expresión de FoxJ2 en las células de la granulosa no muestra asociación alguna con el número de oocitos maduros obtenidos tras punción folicular. Sin embargo, niveles elevados de FoxJ2 en las células de la granulosa correlacionan de forma significativa con baja probabilidad de gestación.

CONCLUSIONES:

Este trabajo revela que FoxJ2 está diferencialmente expresado en las gónadas masculinas y femeninas.

Además, la sobreexpresión de FoxJ2 se asocia a pacientes azoospermicos con fallo severo de espermatogénesis mientras que en el caso de las mujeres la expresión de FoxJ2 es independiente del proceso de la foliculogénesis. Sin embargo, resulta sorprendente observar que la sobreexpresión de FoxJ2 en las células de la granulosa correlaciona con una reducción significativa de la probabilidad de gestación. Estos datos son consistentes con el fenotipo de infertilidad previamente observado en ratones transgénicos de sobreexpresión para Foxj2. En conclusión, la expresión modificada del factor de transcripción FoxJ2 podría explicar, a nivel molecular, algunos trastornos de infertilidad humana.

003: EFECTO DE LA OXIDACION DEL ADN EN EL ESPERMATOZOIDE DE ORIGEN TESTICULAR SOBRE LA CALIDAD EMBRIONARIA Y EL EMBARAZO EN CICLOS CON OVOCITOS DONADOS

C. Aguilar, N. Garrido, S. García-Herrero, E. O'Connor, T. Viloría, M. Meseguer
Instituto Universitario IVI Valencia

INTRODUCCIÓN:

La calidad del ADN espermático ha sido una cuestión de interés desde los primeros problemas prenatales encontrados tras el ICSI en comparación a la población general. Este problema es aun más preocupante en aquellos varones con factor masculino severo, donde por diversos motivos la espermatogénesis no está completada.

Por otro lado, sabemos que el estrés oxidativo se ha relacionado con ambos aspectos; el factor masculino y en la integridad del ADN espermático. Mediante este estudio pretendemos determinar la relevancia que la oxidación del ADN causada por los radicales libres en los espermatozoides de origen testicular obtenidos mediante biopsia.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Realizamos un estudio prospectivo

observacional en el que analizamos los espermatozoides testiculares de 57 varones azoospermicos (de origen obstructivo y secretor) en los que se realizó una extracción espermática mediante biopsia de testículo abierta y un posterior tratamiento de reproducción asistida utilizando ovocitos donados, permitiendo una estandarización de la calidad ovocitaria y reduciendo el sesgo introducido por la misma. Una pequeña alícuota de espermatozoides testiculares fue apartada, suspendida en Etanol 70% y guardada a -80°C para su posterior análisis. Para medir la oxidación del DNA se utilizó el OXI DNA assay kit (OxiDNA Assay, Calbiochem, Barcelona, España), basado en la unión directa de un anticuerpo fluorescente a la 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) un producto de la oxidación por el ataque de los radicales libres. Además para determinar la ploidía de las células testiculares (y poder distinguir los distintos tipos celulares de la línea

germinal) se realizó un marcaje doble con Ioduro de Propidio. La doble fluorescencia individualmente en cada espermatozoide mediante citometría de flujo (Coulter Cytometry, Hialeah, FL). Los datos obtenidos se expresaron como porcentaje de espermatozoides positivos e intensidad de fluorescencia.

RESULTADOS:

En la siguiente tabla presentamos la proporción de células en función de su ploidía y la proporción de células oxidadas en función de su ploidía, en pacientes con azoospermia obstructiva (AO) y azoospermia secretora (AS).

Encontramos una relación estadística muy débil entre la Oxidación del ADN, la fecundación y los parámetros embrionarios de calidad morfológica existentes tanto en los primeros días de desarrollo (2-3) como en los últimos (5-6). En referencia al embarazo el análisis

		ANO (n=39)	AO (n=18)	p
Ploidia (%)				
IIaploides		83.14 (SD-18.18)	86.12 (SD-11.99)	0.555
Diploides		12.72 (SD-14.33)	9.76 (SD-7.99)	0.448
Tetraploides		4.14 (SD- 6.52)	3.62 (SD- 5.97)	0.781
% de células oxidadas				
IIaploides	%	9.09 (SD- 7.67)	4.56 (SD- 5.78)	
	Intensidad	416.81 (SD- 175.28)	497.14 (SD- 210.96)	0.023
Diploides	%	3.52 (SD- 4.89)	1.77 (SD- 2.38)	0.191
	Intensidad	393.19 (SD- 147.32)	483.39 (SD-214.01)	0.133
Tetraploides	%	2.52 (SD- 4.29)	2.36 (SD- 4.06)	0.901
	Intensidad	338.88 (SD-199.49)	265.19 (SD- 249.79)	0.264

de curvas ROC reveló que la oxidación del ADN no tiene poder predictivo para el embarazo siendo el área bajo la curva = 0.496 (IC95% 0.331-0.661).

CONCLUSIONES:

En nuestro conocimiento, este es uno de los pocos trabajos dedicados al análisis

de factores moleculares en espermatozoides de origen testicular. La espermatogénesis deficiente se ve reflejada en un aumento de la oxidación del DNA espermático, actuando como indicador de mala calidad espermática. No obstante las diferencias en los niveles de oxidación del ADN no parecen afectar sustancialmente a la calidad

embrionaria ni a las probabilidades de embarazo, siendo la maquinaria de reparación ovocitaria uno de los posibles factores que explicarían este efecto.

004: EL REANÁLISIS DE EMBRIONES MEJORA LA EFICACIA DEL DGP MEDIANTE FISH

A. Liñán, M. Gaytán, R. Herrero, E. Martínez, M. Ariza, D. Cernuda, F. Bronet.
IVI Madrid

INTRODUCCIÓN:

Mediante FISH, técnica que se utiliza de forma rutinaria en el Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP), podemos conocer el número de copias de cada cromosoma analizado. Se emplea para determinar si el embrión es portador de una anomalía cromosómica numérica (alteraciones en el número de cromosomas) o estructural (translocaciones recíprocas y Robertsonianas, inversiones, deleciones) y para la selección del sexo embrionario en pacientes portadores de enfermedades ligadas a los cromosomas sexuales. De este modo podemos diferenciar entre embriones aneuploides y embriones normales para los cromosomas estudiados antes de ser transferidos al útero materno. Los fallos de diagnóstico pueden variar según el centro, encontrándose una tasa de falsos positivos y falsos negativos del 1,5% y del 19% respectivamente.

Una de las complicaciones más frecuentes son las falsas monosomías, las cuales pueden deberse a fallos de hibridación o al solapamiento de señales. El objetivo de este estudio es analizar qué porcentaje de monosomías son reconfirmadas como tales tras la rehibridación con sondas teloméricas, y cuáles resultan en falsas monosomías.

MATERIAL Y MÉTODOS:

En total se reanalizaron 339 monosomías de 271 embriones. Estos embriones proceden de 136 pacientes incluidos en el programa de Diagnóstico Genético Preimplantacional de la clínica. El estudio se ha realizado durante el período de tiempo comprendido entre octubre de 2008 y mayo de 2009.

RESULTADOS:

En 205 casos (60,5%) se confirmaron las monosomías, y en 134 casos (39,5%) las

monosomías eran falsas. Estos porcentajes varían dependiendo del cromosoma analizado, de modo que cuando analizamos las falsas monosomías procedentes de señales originadas por sondas centroméricas (cromosomas 15, 16, 17 y 18) el porcentaje de monosomías reales es de un 50,6%.

CONCLUSIONES:

Para la mayoría de los cromosomas, el reanálisis con sondas teloméricas mejora la eficacia del diagnóstico mediante FISH y disminuye la tasa de error, por lo que se recomienda el uso de estas sondas como estrategia de mejora de resultados tras el análisis de FISH. Esta recomendación toma especial importancia cuando tratamos con monosomías detectadas con sondas centroméricas.

005: DERIVACIÓN DE ESCh A PARTIR DE BLASTOCISTOS VITRIFICADOS

M. D. Lozano Arana¹, C. Moya-Alarcón¹, Y. Aguilera², K. Hmadcha², G. Antiñolo¹.

¹Unidad clínica de Genética y Reproducción. H.H.U.U. Virgen del Rocío. Sevilla. ²Centro Andaluz de Medicina Regenerativa y Biología Molecular. Sevilla

INTRODUCCIÓN:

El uso de componentes animales no es deseable para la derivación de líneas de células madre embrionarias humanas (ESCh). Entre los diferentes métodos para la derivación de ESCh se encuentra el método mecánico, que no requiere de la utilización de dichos componentes.

Nuestro objetivo es describir el método mecánico para la derivación de ESCh a partir de blastocistos vitrificados procedentes de un programa de Diagnóstico Genético Preimplantatorio (PGD).

MATERIAL Y MÉTODOS:

Hemos utilizado 44 blastocistos vitrificados procedentes del programa de PGD y donados a un proyecto de investigación.

Los blastocistos son desvitrificados y cultivados hasta que alcanzan el estadio "hatching" o "hatched".

El aislamiento mecánico se realiza de forma manual bajo estereomicroscopio utilizando dos agujas de insulina estériles (25G), una para sujetar el preembrión por el trofoectodermo presionando sobre el fondo de una placa y la otra para seccionar separando la masa celular interna (ICM). Eliminamos los restos de trofoectodermo utilizando pipetas pasteur estiradas. La siembra se realiza sobre fibroblastos fetales humanos inactivados con mitomicina C cultivados con medio K-SR.

RESULTADOS:

Tras la desvitrificación de los 44 blastocistos superaron el proceso 31 (70,5%). Evolucionaron a estadio de blastocisto hatching/hatched 18 (58,1%), observándose ICM bien definida en 6 de ellos. Tras el aislamiento mecánico constatamos fijación en 5 casos, que se corresponden con blastocistos con ICM definida, y se observó crecimiento en 3 de ellos. Actualmente tenemos 1 línea estable

en fase 60-70, las otras dos aún se encuentran en proceso de caracterización.

CONCLUSIONES:

El aislamiento mecánico de la ICM es un procedimiento simple y rápido, libre de xenoproductos y ofrece buenos resultados. La calidad de la ICM de los blastocistos es una cualidad crítica para el éxito en el establecimiento de una línea de ESCh. Con la introducción de la vitrificación, hemos obtenido una alta eficiencia en la obtención de líneas de ESCh procedentes de embriones criopreservados a los que se les ha realizado biopsia embrionaria. Esta nueva línea estable será la segunda que nuestro centro deposita en el Banco Nacional de Líneas Celulares.

006: IDENTIFICACIÓN DE UN MÉTODO NO INVASIVO EN ENDOMETRIOSIS

1A. Ametzazurra, 1D. Nagore, 2R. Matorras, 2A. Expósito A, 2L. Crisol, 2F. Azpichueta.

1Proteómica SL. Parque Tecnológico de Vizcaya (Derio) 48160 Vizcaya. 2Unidad de Reproducción Humana, Hospital de Cruces (Baracaldo). Vizcaya.

INTRODUCCIÓN:

El desarrollo de los métodos de diagnósticos no-invasivos para la endometriosis requiere biomarcadores de enfermedad sensibles y específicos.

OBJETIVOS:

Describir el uso de aspirado endometrial de mujeres con y sin endometriosis como

una nueva muestra biológica para descubrir biomarcadores.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Evaluamos diferentes perfiles proteicos de aspirados de mujeres con endometriosis temprana (n=14), endometriosis avanzada (n=32) y sin evidencias de enfermedad (sanas) (n=32) mediante gel bi-dimensional de electroforesis (2-DE).

El estudio de la validación de un biomarcador se realizó en un cohorte independiente (endometriosis temprana n=6 y endometriosis avanzada n=14, controles n=159).

RESULTADOS:

El análisis ha permitido identificar 31 proteínas con diferencias estadísticamente significativas en su

expresión. Las proteínas identificadas están relacionadas con la señalización celular, muerte celular y movimiento celular. Las diferencias observadas en la expresión para 14-3-3 (transducción de señal) y "moesin" (estructura del citoesqueleto) fueron confirmadas en un grupo independiente de pacientes con

endometriosis.

CONCLUSIONES:

El fluido endometrial representa una nueva herramienta para análisis proteómicos ofreciendo información específica en la expresión de proteínas,

facilitando el descubrimiento de biomarcadores para la endometriosis. Los resultados aquí descritos complementan estudios proteómicos previos, añadiendo nuevas proteínas relacionadas con la endometriosis para ser validados como marcadores de diagnóstico.

007: ACTIVACIÓN PARTENOGENÉTICA COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO DE LA COMPETENCIA CITOPASMÁTICA

L. Escrich, N. Grau, D. Castelló, A. Galán, S. Pérez, M. J. Escribá
Laboratorio de Embriología Clínica. IU-IVI. IVI Valencia.

INTRODUCCIÓN:

Los oocitos en estadio de vesícula germinal (VG), recuperados tras punción folicular en un ciclo de estimulación ovárica son capaces de reanudar espontáneamente la meiosis y madurar hasta un nuevo secuestro meiótico en MII en una amplia variedad de condiciones y medios de cultivo, rindiendo generalmente tasas superiores al 60% de maduración nuclear.

Por su parte, la maduración citoplasmática incluye en sí, la capacidad oocitaria de reanudar el segundo bloqueo meiótico y culminar la meiosis con la extrusión del primer corpúsculo polar (1CP) y la formación pronuclear ante un estímulo eficiente de activación. Generalmente, dicho estímulo es el espermatozoide, reportándose tasas de fecundación de oocitos madurados in vitro comparables a las obtenidas con oocitos madurados in vitro (70-80%). Los preembriones generados a partir de oocitos madurados in vitro presentan una elevada incidencia de aneuploidías, debidas principalmente a una segregación alterada de los cromosomas maternos mas que al propio espermatozoide.

En esta comunicación presentamos la activación partenogenética artificial como método diagnóstico de la

competencia citoplasmática oocitaria, alternativo a la fecundación in vitro; evitando así, la validación de una técnica de dudosa eficacia mediante la generación de preembriones sin una finalidad propiamente reproductiva.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Un total de 129 oocitos MII, procedentes de VG maduras in vitro fueron sometidos a un tratamiento de activación partenogenética artificial. En síntesis, los oocitos MII se incubaron en 1mL de solución de ionóforo de calcio (A23187; 5 mM/L) durante 5 minutos. Trascorrido este tiempo, los oocitos se transfirieron a una solución de puomicina (10 µg/mL) donde permanecieron durante 4-5 horas.

Tras el tratamiento de activación, los oocitos se cultivaron overnight en hTF en condiciones estándar de cultivo (37°C y 5% CO2 en aire). Tras 16-20 horas, se evaluó la presencia del segundo corpúsculo polar y los pronúcleos. Los oocitos fueron considerados como activados cuando presentan al menos un pronúcleo (PN), independientemente de la extrusión del segundo corpúsculo polar (2CP).

Del mismo modo, como grupo control, activamos 25 MII madurados in vivo y donados a investigación.

RESULTADOS:

Todos los oocitos MII madurados in vivo (control) activaron, presentando además una respuesta normal de activación (1CP+2CP+1PN). Este porcentaje de activación fue significativamente superior al observado en los oocitos madurados in vitro (59.7%; p<0.05).

CONCLUSIONES:

La activación partenogenética es un buen método diagnóstico para el estudio de la competencia citoplasmática tal y como sugieren las tasas de activación observadas en oocitos MII madurados in vivo (100%). Esta nueva herramienta diagnóstica presenta como particular ventaja permitir evaluar la competencia oocitaria sin la generación de preembriones potencialmente viables.

Las condiciones de maduración en las que se ha realizado este estudio preliminar parecen ser insuficientes para una completa y correcta maduración oocitaria, ya que las VG maduras espontáneamente in vitro son citoplasmáticamente menos competentes que los madurados in vivo.

008: COMPARACIÓN ENTRE DESCONGELACIÓN LENTA Y DESVITRIFICACIÓN DE EMBRIONES. UN AÑO DE RESULTADOS.

M. Bellés, J. M. Molina, E. Bonilla, A. Múgica, M. Esbert, M. Florensa, M. Riqueros, A. Ballesteros, G. Calderón.

IVI Barcelona

INTRODUCCIÓN:

Desde la aparición de la nueva técnica de criopreservación de embriones conocida como vitrificación, son numerosos los estudios que tratan de comparar sus resultados con los obtenidos mediante la congelación convencional. Las bajas tasas de éxito de la descongelación lenta pueden ser debidas a los efectos deletéreos producidos por la formación de cristales de hielo intracelulares durante el enfriamiento. La vitrificación, sin embargo, también puede producir lesiones ocasionadas por los cambios osmóticos y la toxicidad originada por la alta concentración de los crioprotectores.

Objetivo: Analizar los resultados obtenidos mediante las dos técnicas de criopreservación embrionaria.

MATERIAL Y MÉTODOS:

El estudio incluye 303 casos de pacientes sometidos a un ciclo substituido para la recepción de embriones congelados. En el laboratorio de FIV de IVI Barcelona la congelación

lenta fue substituida por la vitrificación en el primer trimestre del 2008 y durante el resto del año se descongelaron embriones por ambos

aspiración de células degeneradas en el caso que las hubiera.

RESULTADOS:

	Descongelación	Desvitrificación	Significancia
Nº de casos	181	119	
Nº de embriones descongelados	659	276	
Nº embriones transferidos	355	246	
Media embriones descongelados por paciente	3,71±1,49	2,78±1,35	p=0.000
Nº de embriones que sobreviven (%)	369 (55,99)	251 (87,76)	N.S.
Nº embriones intactos (%)	114 (17,29)	198 (71,74)	p<0.0001
Nº de transfers (%)	157 (85,33)	114 (95,80)	p=0.004
Media de embriones transferidos	1,93±1,04	2,07±0,67	N.S.
Nº de gestaciones (%)	72 (45,86)	50 (43,86)	N.S.
Tasa implantación	28,06%	28,59	N.S.
Nº embarazos múltiples (%)	25 (34,00)	24 (48,00)	N.S.
Nº abortos (%)	15 (20,83)	11 (22,00)	N.S.

métodos para realizar transferencias.

Las técnicas que utilizamos para ello fueron la descongelación lenta en la que se utilizan soluciones de 0.2M SAC y 1.5M PROH para embriones de D3 y 0.4M SAC y 10% Glicerol para embriones de D5. En la desvitrificación se utilizó el protocolo "Cryotop Safety Kit-Thawing".

A todos los embriones descongelados en día 3 se les hizo eclosión asistida y

CONCLUSIONES:

Gracias a la introducción de la vitrificación, el rendimiento obtenido en el programa de congelación embrionaria es claramente superior al obtenido con la congelación lenta ya que necesitamos menos embriones descongelados para poder realizar una transferencia y conseguir una gestación.

009: RESULTADOS EN PAREJAS SERODISCORDANTES AL VIH Y/O VHC CON EL VARÓN INFECTADO.

A. Mencías, C. Rico, Y. Márquez, P. Rodríguez, A. Zurilla, N. Garrido

IVI, Valencia

INTRODUCCIÓN:

El lavado del semen en varones seropositivos para virus de la hepatitis C y el virus de inmunodeficiencia humana permiten la utilización exclusiva de la fracción móvil de los espermatozoides para las técnicas de reproducción asistida, eliminando de este modo los componentes seminales con demostrada presencia de los virus.

Así pues, el lavado del semen seguido del estudio posterior de la presencia del virus por técnicas de PCR, hace posible descartar aquellas muestras en las cuales el lavado no ha tenido éxito y aplicar en los negativos, sin presencia viral, la técnica de reproducción asistida que más se ajuste a las características de los pacientes y del semen lavado. De esta manera se consigue no infectar a la mujer ni a la descendencia, lo cual está

avalado por los resultados de diferentes grupos de investigación. El objetivo de nuestro trabajo es determinar retrospectivamente la tasa de éxito en el uso de este tipo de muestras para poder proveer de la información adecuada a los pacientes en estos casos acerca de las expectativas de estos procedimientos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Hemos analizado retrospectivamente nuestra experiencia de 8 años, en un trabajo descriptivo, identificando los casos de varones seropositivos a VIH y VHC, entre más de 50000 historias clínicas en la clínica IVI Valencia.

En estos casos, los lavados fueron realizados mediante capacitación doble del semen, primero mediante gradientes de densidad, y luego por swim-up. La fracción resultante fue dividida en dos mitades iguales, una de las cuales fue congelada para su futuro uso en reproducción asistida, y la otra analizada mediante PCR anidada, de alta sensibilidad, para determinar la presencia de partículas virales. En aquellos procedimientos en los que no se detectó presencia viral en el semen lavado, se iniciaron los tratamientos de reproducción asistida. Los tratamientos de reproducción a los que se sometieron las parejas, se decidieron según la calidad del semen tras lavado, así como las características ginecológicas de la mujer, y básicamente se dividen en fecundación in vitro con óvulos propios, con óvulos donados, y transferencia de embriones congelados.

RESULTADOS:

Se identificaron un total de 370 tratamientos, de los cuales, 221 fueron

con ovocitos propios, 86 con ovocitos donados y 63 con la transferencia de embriones congelados.

Se lograron 105 gestaciones (47.5% por ciclo) con propios, 48 (55,8% por ciclo) con donación de óvulos, y 21 (33,3% por ciclo tras transferencia de congelados).

En función de la infección, los resultados pueden verse en la Tabla 1.

TRA	INFECCION	GESTACIONES TASA
OVOCITOS PROPIOS	VIIC	46 48,4%
	VIH	26 57,8%
	VIH/VHC	33 40,7%
	VIIC	31 57,4%
OVOCITOS DONADOS	VIH	5 41,7%
	VIII/VIIC	12 60,0%
	VHC	13 44,8%
TRANSF. CONGELADOS	VIH	0 0,0%
	VIII/VIIC	8 33,3%

Tabla 1.

No se ha reportado hasta la fecha una transmisión horizontal o vertical en lo seguimientos de los recién nacidos o sus madres.

CONCLUSIONES:

El lavado de semen para pacientes con VIH y VHC es una opción segura para la mujer y el futuro recién nacido, así como eficaz dados los resultados obtenidos, ya que son comparables a los que se presentan en fecundación in vitro por otras indicaciones.

010: ANÁLISIS METABOLÓMICO NO INVASIVO DEL MEDIO DE CULTIVO EMBRIONARIO MEDIANTE HPLC Y RMN.

B. Lledó¹, J. A. Ortiz¹, C. Pérez², M. Pérez², R. Gonsálvez-Álvarez³, E. Martínez-Sabater³, F. Marhuenda-Egea³, R. Bernabeu⁴.
¹Instituto Bernabeu Biotech, ²Instituto Bernabeu Cartagena, ³Instituto Bernabeu Alicante, ⁴Universidad de Alicante

INTRODUCCIÓN:

La tasa de implantación embrionaria es una de las limitaciones de las técnicas de reproducción asistida. La capacidad de identificar a los embriones con mayor capacidad implantatoria dentro de una cohorte, permitirá incrementar las tasas de éxito de las TRA así como disminuir los embarazos múltiples. Actualmente, la clasificación morfológica es la única herramienta no invasiva para seleccionar aquellos embriones con

mayor capacidad implantatoria. Sin embargo, algunos de los embriones considerados de buena calidad no implantan y sí otros catalogados de peor pronóstico. La metabolómica es una reciente disciplina que analiza, a nivel celular, el conjunto de los metabolitos (moléculas de bajo peso molecular de origen no protéico, pj: ATP, aminoácidos, glucosa...etc.) que representa el fenotipo funcional. Recientes estudios sugieren que el perfil metabólico del embrión puede influir en su potencial. El

metabolismo del piruvato y lactato como principal fuente de energía en embriones hasta día 3 no aportan resultados concluyentes. Por otro lado, se ha visto que el consumo de glucosa se ve incrementado en embriones que evolucionan hasta estadio de blastocisto. En cuanto al metabolismo de los aminoácidos, se ha observado una correlación inversa entre su consumo y la viabilidad embrionaria. Nuestro objetivo ha sido desarrollar técnicas analíticas capaces de identificar y

cuantificar aquellos aminoácidos relacionados con la capacidad implantatoria del embrión.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se empleó medio de cultivo embrionario G1.3 (Vitrolife) para optimizar las técnicas analíticas. Previo al HPLC-MS/MS las muestras fueron diluidas (espectrómetro de masas Agilent, modelo 5973 Network). La columna fue una Luna 5 μ SCX 100 Å. Las muestras para RMN se filtraron previamente con el objetivo de eliminar la HSA ya que interfería en el resultado (filtro de 5 kDa). Se llevó a cabo una espectroscopia de resonancia magnética nuclear 1H de alto campo utilizando un espectrometro Bruker 400 Mhz con una secuencia de pulso especial para la eliminar la señal

del agua, acumulando 2000 scans por muestra. Los patrones se realizaron a partir de soluciones de los aminoácidos presentes en el medio de cultivo a distintas concentraciones.

RESULTADOS:

Mediante RMN se obtuvieron diferentes espectros. La fase y la línea base se corrigieron manualmente y las señales se asignaron empleando datos previos. En aquellos espectros realizados con muestras sin filtrar no se pudo identificar de forma reproducible los diferentes componentes del medio. Tras el filtrado se consiguió identificar los aminoácidos que constituyen el medio para posteriormente observar las variaciones de concentración. La cromatografía de HPLC,MS/MS permitió

reconocer todos los aminoácidos presentes en el medio de cultivo, así como la cuantificación de los mismos, con una gran sensibilidad.

CONCLUSIONES:

Se ha desarrollado un método analítico para la identificación y cuantificación de los aminoácidos presentes en los medios de cultivo embrionarios. A partir de estos resultados hemos iniciado un proyecto con el objetivo de establecer una relación entre el metabolismo de los aminoácidos en embriones en cultivo y las tasa de implantación y embarazo evolutivo. De este modo se podrá disponer de una nueva herramienta no invasiva para la selección de embriones con mayor capacidad implantatoria.

011: ESTUDIO PROSPECTIVO Y RANDOMIZADO SOBRE LA UTILIDAD DEL DGP EN PAREJAS CON FALLO REPETIDO DE IMPLANTACIÓN: RESULTADOS PRELIMINARES

C. Rubio, L. Rodrigo, A. Mercader, M. J. de los Santos, J. Domingo, J. Remohí, A. Pellicer
Instituto Valenciano de Infertilidad IVI-Valencia

INTRODUCCIÓN:

Objetivo: Comparar de forma prospectiva y randomizada la eficacia de la selección embrionaria cromosómica y morfológica en pacientes con fallo repetido de implantación. Los dos tratamientos que se compararon en el estudio fueron: ciclos con transferencia de embriones en el estadio de blastocisto, pero sin análisis cromosómico (Grupo A) y ciclos con Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) para screening de aneuploidías con transferencia en día 5 (Grupo B).

MATERIAL Y MÉTODOS:

Selección de pacientes:

- Criterios de inclusión: Pacientes < 40 años, con ≥ 3 ciclos previos de FIV/ICSI sin gestación, con transferencia en fresco de al menos 1 embrión de buena calidad en cada ciclo. Se realizó una asignación aleatoria por bloques: cocultivo (grupo A)

y DGP (grupo B). Se calculó un tamaño muestral de 100 pacientes en cada grupo considerando relevante una diferencia en la tasa de implantación evolutiva entre los grupos de 10-15%, con una potencia del 80% y un error del 5%.

- Estudio previo: Ecografía vaginal (y eventual histerosonografía) y si fuera necesario histeroscopia, cariotipos de la pareja y estudio de trombofilias (anticuerpos anticardiolipina (lupus anticoagulans, antitrombina III, mutación factor V Leiden, proteína C y S, homocisteína sérica, mutación MTHFR, mutación factor II).

- Criterios de exclusión: Cualquier alteración del estudio previo de fallo de implantación, cualquier anomalía morfológica uterina, aunque se trate de un simple pólipo, presencia de hidrosálpinx, una transferencia previa dificultosa y pacientes con abortos o embarazos ectópicos previos.

Tipo de intervención:

- GRUPO A: cocultivo con transferencia en día 5-6 sin DGP. El cocultivo se realizó siguiendo el protocolo convencional cultivando los embriones con una monocapa de células epiteliales de endometrio desde el día 2 al día 5-6 de desarrollo embrionario.

- GRUPO B: cocultivo con transferencia en día 5 y con DGP. La biopsia embrionaria se realizó en el tercer día de desarrollo embrionario y se analizaron los cromosomas 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X e Y mediante hibridación "in situ" fluorescente (FISH). Las sondas de ADN utilizadas fueron las comercializadas por Vysis (Vysis Inc., Downers Grove, Illinois, USA). Se realizó el estudio de los 9 cromosomas en 2 rondas consecutivas de hibridación y con rondas adicionales de hibridación para descartar falsas monosomías e incrementar la eficiencia del diagnóstico mediante el uso de sondas subteloméricas o específicas de locus.

RESULTADOS:

	Cocultivo	DGP
Nº ciclos	25	32
Nº transferencias (%)	20 (83,0)	27 (84,4)
Edad media ± DS	35,9 ± 2,4	34,5 ± 3,6
Fallos previos ± DS	3,0 ± 0,0	3,5 ± 1,0
Media MII ± DS	9,1 ± 4,9	10,1 ± 4,5
Media embriones transferidos ± DS	1,7 ± 0,5	1,6 ± 0,6
% Gestaciones Clínicas / transfer	30,0	48,1
% Gestaciones Clínicas / ciclo	24,0	40,6
Abortos (%)	1 (16,7)	1 (7,7)
Tasa de Implantación	23,5	37,2
% Gestaciones evolutivas*/ transfer	25,0	44,4
% Gestaciones evolutivas*/ ciclo	20,0	37,5
Tasa de implantación evolutiva*	19,4	34,9

NS: Fisher´s exact test (p<0,05)

* Se definió como evolutivo el embarazo en curso con más de 12 semanas.

CONCLUSIONES:

El análisis intermedio de los resultados obtenidos en el estudio muestra mejores resultados en el grupo en el que se realizó DGP, con tasas de implantación y embarazos evolutivos por ciclo 15 puntos superiores a las obtenidas en el grupo sin DGP. Las diferencias actuales coinciden e incluso mejoran nuestra hipótesis de partida y de mantenerse estas diferencias entre los grupos, podríamos obtener diferencias estadísticamente significativas a favor de la aplicación de DGP en este grupo concreto de pacientes con un tamaño muestral inferior al inicialmente calculado.

012: ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS EN EMBRIONES PROCEDENTES DE CICLOS DE MADURACIÓN IN VITRO.

D. Tuñón^{1*}, M. Parriego¹, G. Arroyo¹, M. Boada¹, R. Tur¹, P. N. Barri¹, A. Veiga^{1,2}.

¹ Servicio de Medicina de la Reproducción. Departamento de Obstetricia, Ginecología y Reproducción. Institut Universitari Dexeus. Barcelona.

² Banco de Líneas Celulares. Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona. Barcelona.

INTRODUCCIÓN:

La Maduración In Vitro (MIV) de ovocitos puede ofrecerse como una alternativa a la Fertilización In Vitro (FIV) a determinados grupos de pacientes: mujeres con riesgo de hiperestimulación ovárica y aquellas diagnosticadas de Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP).

Aunque se han descrito tasas de implantación y embarazo adecuadas en ciclos MIV, éstas son inferiores a las obtenidas después de ciclos FIV. Se trata de embriones de baja calidad, sugiriéndose la disrupción del huso meiótico de los ovocitos MIV como origen de anomalías cromosómicas relacionadas con un inadecuado desarrollo embrionario.

El objetivo ha sido analizar la constitución nuclear y cromosómica de embriones derivados de ciclos MIV no aptos para su transferencia y/o criopreservación. Se procedió a evaluar la incidencia y el tipo de anomalías cromosómicas.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio prospectivo de 12 ciclos MIV realizados en Institut Dexeus desde febrero del 2008 hasta mayo del 2009. Siete pacientes diagnosticadas como SOP siguieron ciclos espontáneos o de estimulación suave con rFSH. La punción ovárica se realizó a las 36 horas post hCG. Los ovocitos inmaduros se cultivaron In Vitro durante 24-48 horas hasta alcanzar el estadio de metafase II (MII). Sólo los ovocitos maduros fueron microinyectados (ICSI).

Embriones bloqueados, con alto porcentaje de fragmentación y/o blastómeros multinucleados se consideraron como no aptos para transferir o congelar. Un total de 32 embriones se descartaron e incluyeron en el estudio.

Los embriones fueron disgregados para analizar individualmente cada célula. Se analizó la constitución nuclear y cromosómica de los blastómeros, determinándose la dotación cromosómica

mediante Hibridación In Situ Fluorescente para los cromosomas 13, 16, 18, 21 y 22.

Se analizaron 132 blastómeros procedentes de 32 embriones de 8 ciclos MIV.

RESULTADOS:

Una media de 14.9 ± 8.2 ovocitos por ciclo fueron recuperados de los 8 ciclos MIV. El día de la punción ovárica, 2 ovocitos se encontraban en estadio MII mientras que 117 en estadio de vesícula germinal. De los ovocitos inmaduros, 87 (74.4%) alcanzaron el estadio de MII tras su cultivo In Vitro. La tasa de fecundación tras ICSI fue 69.7%.

Treinta y nueve de los 62 embriones correctamente fecundados (62.9%) fueron clasificados como no aptos para la paciente. Este porcentaje es superior al obtenido en nuestro programa de FIV (32.2%).

Se analizaron 132 blastómeros de 32 embriones analizados. Veintiocho de las

células (21.2%) mostraron un único núcleo después de la fijación, 55 de los blastómeros (41.7%) mostraron más de un núcleo o fragmentos de cromatina, en 39 casos se observó ausencia de núcleo (29.5%), en 9 casos (6.8%) presencia de cromosomas y un único blastómero se perdió durante la fijación (0.8%). El 81.3 % de los embriones presentaba como mínimo una célula multinucleada.

Sólo 3/32 embriones (9.4%) fue normal para los cromosomas estudiados y éstos procedían de ovocitos madurados tras 24

horas en cultivo. Todos los embriones en los que se analizó más de una célula y diagnosticados como anormales presentaban una dotación cromosómica al azar, siendo clasificados como mosaicos caóticos (24/32, 75%).

CONCLUSIONES:

La gran mayoría de los embriones descartados de ciclos MIV mostraron anomalías cromosómicas severas, observándose una alta incidencia de multinucleación y mosaicismo.

Las anomalías cromosómicas podrían estar relacionadas con el bajo potencial de desarrollo embrionario y con la baja tasa de implantación obtenida en MIV. Convendría conocer la constitución cromosómica de los embriones transferidos y establecer la utilidad del screening de aneuploidias en ciclos MIV en ciclos con un mínimo de embriones a analizar.

013: LAS VARIANTES CROMOSÓMICAS AFECTAN LAS TASAS DE ÉXITO EN PACIENTES SOMETIDAS A FIV-ICSI.

M. Poveda¹, L. Gil¹, T. Rubio³, J. M. Moreno¹, J. J. López-Gálvez¹, M. Lloret¹, J. Rueda², E. López³.

¹ Unidad de Reproducción y ² Genética, Hospital Clínica Vistahermosa de Alicante y ³ Unidad de Reproducción Clínica Virgen de la Vega de Murcia.

INTRODUCCIÓN:

Las variantes cromosómicas observadas en los cariotipos, son regiones de heterocromatina visibles al microscopio que afectan a un número de individuos y que se relacionan con diversos procesos patológicos, incluida la infertilidad.

Según nuestros estudios, un 11,86% de los cariotipos de pacientes, no seleccionados, que acuden a nuestro centro presentan variantes cromosómicas identificables que pudieran interferir de algún modo en el proceso reproductivo. El objetivo de nuestro estudio es relacionar la presencia de estas variantes con la eficiencia de los ciclos de ICSI.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio prospectivo de 81 ciclos de ICSI realizados en nuestro centro en los que algún miembro de la pareja presenta variantes cromosómicas y 169 ciclos de pacientes sometidos a la misma técnica pero con cariotipos normales.

En estos ciclos, se ha obtenido la media de ovocitos metafase II recuperados, tasa de fertilización, porcentaje de fallos

de fertilización, porcentaje de embriones de grado A transferidos y tasa de gestación y aborto.

RESULTADOS:

Los resultados muestran que las variantes cromosómicas más frecuentes son las que afectan al cromosoma 9, presentes en un 73% de los casos (el 37% en mujeres y el 36% en hombres), seguida de la 21ps+, en un 11% de ellos (el 7% en mujeres y en un 4% en hombres). El resto de variantes está en un porcentaje inferior al 10%.

En estos ciclos, la media de ovocitos maduros recuperados tras la punción fue de 9,78, valor muy similar al de los ciclos sin variante (11,44). La tasa de fertilización es también muy similar (61,64% vs. 64%); sin embargo, el porcentaje de fallos de fertilización está más elevado cuando los pacientes presentan un cariotipo con variable que en los casos de cariotipo normal (14,8% vs. 8,30). La tasa de embriones con alto poder implantatorio transferidos en día +3 es muy inferior en los ciclos con cariotipos alterados que en los ciclos con cariotipo normal (48% vs. 77,78%); en cuanto a la tasa de embarazo por ciclo,

observamos que es del 31,25% cuando existe alteración frente a un 43,09% en el resto de pacientes sometidos a la misma técnica. La tasa de aborto es del 15% y 9,75%, respectivamente.

CONCLUSIONES: Los resultados muestran que si bien el número de ovocitos y tasa de fertilización es similar en ambos grupos, existe una mayor tasa de fallos de fertilización en los ciclos en los que uno de los miembros de la pareja presenta una variante cromosómica en el cariotipo. Además, en los ciclos con variantes de la heterocromatina, se generan y transfieren un menor porcentaje de embriones de grado A, lo que podría explicar la menor tasa de embarazo y mayor de aborto que hay en estos ciclos.

Por tanto, y aunque no podemos conocer el modo en que la presencia de estas variables pueda afectar la embriogénesis, si observamos que los resultados de los ciclos de ICSI empeoran cuando existe alguna variante, sobretodo, en cuanto a fallos de fertilización y calidad embrionaria y por consiguiente, a la tasa de embarazo.

014: VIABILIDAD Y POTENCIAL DE IMPLANTACIÓN DE LOS EMBRIONES MULTINUCLEADOS CON RITMO ÓPTIMO DE DIVISIÓN EN LOS PRIMEROS ESTADÍOS DEL DESARROLLO EMBRIONARIO.

M. C. Pons, M. Grossmann, I. Solvas, R. Noblom, X. Julve, J. Nadal.
Centro Médico Teknon. Unitat Reproducció Assistida, Barcelona

INTRODUCCIÓN:

La multinucleación se asocia a un desarrollo embrionario deficiente (ritmo de división lento, fragmentación, tamaño desigual de los blastómeros) correlacionado con una baja tasa de implantación. Sin embargo, la presencia de multinucleación también se observa en embriones con un desarrollo óptimo. Según la clasificación embrionaria de ASEBIR, la mera presencia de multinucleación en un solo blastómero se penaliza clasificando al embrión directamente en la categoría D. Ante esta situación, el objetivo del trabajo es investigar el impacto de la multinucleación cuando se presenta como única anomalía, a través del análisis de la viabilidad y el potencial de implantación en embriones de excelente desarrollo embrionario aunque con blastómeros multinucleados.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo de 1173 embriones con desarrollo embrionario óptimo (DT: división temprana y estadio de 4- ó 5-células en día +2) pertenecientes a 515 ciclos de FIV realizados entre 2005 y 2008.

es de 26,3 [rango: 23-29 h] y la observación en día+2 se realiza entre las 43 y las 45 horas post-inseminación. A pesar que las transferencias se realizan en día+3, en este estudio la nucleación se ha valorado en día+2 para garantizar la correcta evaluación de la nucleación en cada uno de los blastómeros.

Se comparan las tasas de viabilidad y de implantación entre el grupo de embriones multinucleados (d+2-MNB) y el de embriones no multinucleados (d+2-noMNB). La tasa de implantación se calcula respecto a los embriones transferidos en transferencias con 100% de implantación, transferencias con 0% de implantación y transferencias homogéneas, en las que todos los embriones transferidos muestran las mismas características. Análisis estadístico: Fisher exact test, $P < 0,001$.

RESULTADOS:

De los 1173 embriones estudiados, 152 presentan algún blastómero multinucleado en día+2 (12,9%). En la tabla siguiente se muestran las tasas de viabilidad y de implantación en función de la presencia de multinucleación.

multinucleados. Por el contrario, si los embriones multinucleados llegan a ser transferidos, observamos que la tasa de implantación, aunque tiende a disminuir, no se diferencia respecto a la de los embriones no multinucleados (20% versus 28,9%). Los 8 embriones del grupo d+2-MNB que implantan presentan un bajo grado de multinucleación: un único blastómero binucleado frente al resto de blastómeros uninucleados.

CONCLUSIONES:

- 1/. La sola presencia de algún blastómero multinucleado en embriones con características óptimas de desarrollo determina una marcada disminución en la viabilidad de dichos embriones.
- 2/. Los embriones multinucleados viables que son transferidos poseen un potencial de implantación equivalente al de los embriones no multinucleados, debido probablemente a la baja proporción de blastómeros multinucleados.
- 3/. Deberíamos revisar la inclusión en la categoría D de los embriones con características óptimas de desarrollo cuya única anomalía es la multinucleación en algún blastómero.

	d+2-MNB	(%)	d+2-noMNB	(%)	Fisher exact test
Núm. embriones	152	12,9	1021	87,1	
Embriones viables	57	37,5	722	70,7	$P < 0,0001$
Embriones criopreservados	7		79		
Embriones transferidos	50		643		
Embr.en transfers homogéneos	40		550		
Embriones implantados	8/40	20	159/550	28,9	ns

La media de edad de las pacientes en estos ciclos fue de 34,4 años [rango: 20-47]. El promedio de horas post-inseminación en el cual se observa la DT

El porcentaje de embriones viables en el grupo de embriones multinucleados es del 37,5%, cifra significativamente muy inferior al 70,7% del grupo de no

015: EFECTO DEL MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO SOBRE LA TASA DE MADURACIÓN NUCLEAR DE OOCITOS VG RECUPERADOS DE CICLOS ESTIMULADOS.

L. Escrich, N. Grau, J. M. de los Santos, A. Tejera, C. Albert, M. J. Escibá
 Laboratorio de Embriología Clínica. IU-IVI. IVI Valencia.

INTRODUCCIÓN:

Los oocitos contenidos en folículos antrales se encuentran secuestrados en profase I, en estadio de vesícula germinal (VG). La extracción de estos oocitos, supone la liberación del secuestro meiótico y la reanudación de la meiosis espontáneamente. De entre los factores que afectan a la maduración, el medio y condiciones empleadas son los que han suscitado mayor interés.

En esta comunicación se compara la tasa de maduración oocitaria espontánea obtenida en dos medios comerciales de cultivo (HTF vs CCM) y dos sistemas de incubación (incubador convencional vs. Embryoscope).

MATERIAL Y MÉTODOS:

El efecto de los medios de maduración se estudió sobre 254 VG que fueron cultivadas en 50µl de medio de cultivo (HTF ó CCM) en incubadores convencionales y en condiciones estándar de cultivo (37°C; 5%CO2 en aire). Tras 24 horas, se evaluó el estado nuclear de los oocitos: GV, MI o MII.

El efecto de dos sistemas de incubación sobre la maduración se estudió en 67 VG; 26 VG fueron cultivadas en 50µl de CCM en incubadores convencionales durante 48 horas, realizando controles discontinuos de maduración cada 24 horas.

41 VG se incubaron en 25µl de CCM en el Embryoscope. Durante 48 horas, se registró cada 15 minutos, 9 fotogramas

correspondientes a 9 planos ecuatoriales diferentes. El escrutinio de la filmación nos permite determinar el grado de maduración finalmente alcanzado.

Las tasas de maduración de los diferentes grupos se analizaron por Chi-cuadrado mediante SPSS 17.0.

RESULTADOS:

La tabla 1 muestra los porcentajes de maduración en los diferentes medios. Un total de 157 VG maduraron a MII (61.8%), independientemente del medio de cultivo empleado (p>0.05). El medio afectó a la distribución de los oocitos inmaduros, siendo más frecuente que las VG se bloqueen en CCM que en HTF (44.4% vs. 18.6%, respectivamente; p=0.009).

Tabla 1	N	GV	MI	MII
HTF	159	13 (8%)	57 (35%)	98 (56%)
CCM	95	16 (17%)	20 (21%)	59 (62%)

La tabla 2 muestra la tasa de maduración de VG cultivadas en incubadores convencionales (n=26) o en el Embryoscope (n=41) durante 24 y 48 horas.

Tabla 2		GV iniciales	GV			MI			MII (%)		
			24 horas	48 horas	Totales	24 horas	48 horas	Totales	24 horas	48 horas	Totales
24 horas	Hereus	26	2 (7.7)	7 (26.9)	17 (65.4)						
	Embryoscope	41	5 (12.2)	9 (21.9)	27 (65.8)						
	Totales	67	7 (10.5)	16 (23.9)	44 (65.7)						
48 horas	Hereus	9	1 (11.1)	3 (33.3)	5 (55.5)						
	Embryoscope	14	5 (35.7)	6 (42.9)	3 (21.4)						
	Totales	23	6 (26.1)	9 (39.1)	8 (34.8)						

Tras 24 horas de maduración, 65.7% de las VG madura a MII, independientemente de las condiciones de incubación (p>0.05). Los oocitos que tras 24 de cultivo permanecían en estadios inmaduros (VG o MI) fueron cultivados durante 24 horas más maduraron a tasas similares.

CONCLUSIONES:

El tipo de medio y las condiciones del cultivo no parecen influir en la tasa de maduración oocitaria nuclear.

Las tasas de maduración de VG recuperados de ciclos de estimulación ovárica controlada maduran espontáneamente con una eficacia de más del 50%, independientemente del medio y condiciones de incubación, lo

que sugiere el carácter preprogramado de la maduración nuclear. Futuros estudios de competencia citoplasmática esclarecerán si ésta está igualmente pre-programada.

016: ESTUDIO DEL DESARROLLO DE PREEMBRIONES TRIPRONUCLEARES HUMANOS SEGÚN TECNOLOGÍA EMBRYOSCOPE O CONVENCIONAL

N. Grau, L. Escrich, J. Herrero, A. Mifsud, J. Zulategui, M. J. Escribá
Laboratorio de Embriología Clínica. IU-IVI. IVI Valencia

INTRODUCCIÓN:

La valoración morfológica de los embriones y el timing de ocurrencia es uno de los principales hitos en el desarrollo, es una de las herramientas diagnósticas más utilizada en Embriología para determinar viabilidad y asistir a la selección embrionaria.

En esta comunicación presentamos los resultados preliminares de cultivo de TPN de ICSI en Embryoscope. El Embryoscope es un incubador, adaptado con sistema de captura y análisis de imagen que permite obtener registros cada 15 minutos en 9 planos diferentes sin alterar, además, las condiciones del cultivo.

Como control, incluimos las observaciones realizados sobre preembriones TPN cultivados y observados de forma discontinua (tradicional), alterando transitoriamente las condiciones de cultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Un total de 43 cigotos TPN fueron identificados y vitrificados usando la metodología de cryotop. Una vez obtenido el CI de los progenitores, 6 TPN fueron desvitrificados; todos sobrevivieron. Tras 2 horas en medio de lavado, los TPN se cultivaron en unas placas proporcionadas por Biosense Inc con 20µl de medio. Durante los primeros 3 días se usó IVF (Vitrolife), y hasta D5/6 se usó CCM, en condiciones estándar (37°C, 5%CO2) y constantes propias del Embryoscope.

De los registros del desarrollo se obtuvo el número de células de la primera y

segunda división, tiempos en que se producen las divisiones y desarrollo a blastocisto.

Como control del desarrollo, un total de 37 TPN fueron igualmente vitrificados / desvitrificados y cultivados como se describe anteriormente con dos diferencias importantes: (1) en microtas de 50µl (2) en incubadores convencionales, por lo que la evaluación no es continua sino discreta, alterando,

Día de desarrollo (n, %)	EMBRYOSCOPE		INCUBADOR CONVENCIONAL	
D1 (fccundación/ vitrificación/desvitrificación)	6		37	
D2	4 (66.7)	3.25±2.1	33 (89.2)	3.73±1.4
D3	2 (33.3)	6.50±3.5	27 (73.0)	6.26±1.8
D5 (Mórulas/Blastocistos)	2 (33.3)		7/6 (35.1)	
D6 (Blastocistos)	2 (33.3)		4 (10.8)	

Tabla 1. Número de especímenes TPN-ICSI

al menos transitoriamente las condiciones del cultivo.

RESULTADOS:

Tras el cultivo en Embryoscope, observamos que el 33.3% de los TPN llegan a blastocisto, porcentaje comparable al grupo control (10.8%; P=0.39).

El número de blastómeros en día 2 y en día 3, escrutados de los datos del Embryoscope a 24 y 48 horas son comparables a los registrados tras observación discontinua en el grupo control (P=0.54 y P=0.86 respectivamente).

La observación de la primera división se produce a las 35.5±10.8 horas generándose en todos los casos 2 células. El 75% de los embriones de 2-

células progresan a 4-células (35.7±4.96), mientras que el 25% progresa a 3-células (34.2).

CONCLUSIONES:

El cultivo y valoración del desarrollo TPN en Embryoscope/incubador convencional no afecta a las tasas globales de desarrollo a blastocisto.

El Embryoscope permite corroborar que

en los TPN de ICSI la primera división ocurre en base 2, según la fórmula 2n.

Antes de emitir conclusiones, es necesario incrementar el tamaño muestral de los TPN cultivados en el Embryoscope. Nuestros resultados preliminares indican que pese a no existir diferencias globales en las tasas de desarrollo a blastocisto, los TPN cultivados en Embryoscope que alcanzan el día 3 de desarrollo, prosiguen a blastocisto con mayor eficacia (2/2; 100%) que aquellos cultivados y observados de forma convencional y discontinua (4/28; 14.3%; p=0.044); es decir, es posible que el cultivo y valoración convencional pudieran penalizar el desarrollo embrionario post-transcripcional (día3-día6).

017: IMPLICACIONES DE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS Y LA MOTILIDAD DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS ANTES Y DESPUÉS DE LA CAPACITACIÓN IN VITRO.

L. Crisol¹, A. Expósito¹, J. I. Ruiz-Sanz², M. B. Ruiz-Larrea², C. Stoppani³, F. Azpichueta¹, R. Matorras¹.

¹Unidad de Reproducción Humana. Hospital de Cruces. Cruces, Vizcaya. ²Departamento de Fisiología Humana. Universidad del País Vasco, Leioa, Vizcaya. ³Departamento de Endocrinología, Universidad de Padova, Padova, Italia.

INTRODUCCIÓN:

La membrana plasmática del espermatozoide posee un papel importante y decisivo en la fertilización, y su composición lipídica es esencial para la óptima motilidad, madurez y función del espermatozoide. Así mismo, la actividad de diferentes enzimas lípido-dependientes unidas a la membrana espermática, así como la resistencia de la membrana al estrés físico y químico, depende de su composición en ácidos grasos. Se ha sugerido que la proporción de ácidos grasos insaturados (AGI) influyen en la fluidez y flexibilidad de la membrana, asimismo son precursores de prostaglandinas y leucotrienos, factores clave tanto en la motilidad espermática como en procesos inflamatorios. El objetivo del presente estudio es evaluar la relación existente entre la motilidad espermática y la composición de ácidos grasos de la membrana de espermatozoides humanos pre-, y post-capacitados.

MATERIAL Y MÉTODOS:

La población en estudio consistió en 50 varones pertenecientes a parejas infértiles adscritas al programa de FIV/ICSI de la Unidad de Reproducción Humana del Hospital de Cruces (Vizcaya), entre Junio y Septiembre del 2008. Los pacientes se clasificaron en

dos grupos dependiendo de su motilidad espermática, en el grupo I (n=25) se incluyeron todas aquellas muestras que presentaban una motilidad progresiva (% a+b) mayor o igual del 40%, mientras que el grupo II (n=25) corresponde a las muestras con una motilidad progresiva menor del 40%. Todas las muestras de semen se recogieron y se analizaron el día de la punción folicular siguiendo los criterios de la OMS. La capacitación in vitro se realizó por el método de Swim up. Se utilizó una alícuota de cada muestra para el análisis de ácidos grasos. Para ello, se procederá a la metilación de los ácidos grasos de las muestras de semen que se realizará siguiendo el procedimiento de Lepage and Roy (1986). Los AG metilados se separarán y cuantificarán en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard GC 5890 equipado con detector de ionización de llama. La cuantificación de cada uno de ellos se lleva a cabo mediante integración electrónica y aplicación de su correspondiente factor de respuesta. Los resultados se expresan como nmol % del total de ácidos grasos identificados.

RESULTADOS:

Antes de la capacitación, los espermatozoides de pacientes del grupo II mostraron de forma significativa mayores niveles de ácidos grasos

saturados (AGS), y una menor contribución de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) que los espermatozoides del grupo I. El contenido total de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) fue similar en ambos grupos. Sin embargo, en las muestras de espermatozoides capacitados, los niveles del ácido docosapentaenoico (22:5 n-3), docosahexaenoico (DHA) (22:6 n-3), AGPI n-3 y el índice de insaturación fueron significativamente menores en el grupo II comparado con el grupo I. Además, la familia n-3 es más representativa que la familia n-6 en individuos del grupo I, por lo tanto el cociente n3/n6 aumenta a favor de los espermatozoides con menos movilidad.

En el análisis de correlaciones, se encontraron correlaciones positivas significativas entre el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva lineal (%a) con los niveles de DHA, AGPI n-3 y el índice de insaturación en las muestras capacitadas.

CONCLUSIONES:

Los niveles adecuados de AGPI, especialmente los de la familia n-3, está asociado a una óptima motilidad espermática, que es requerida para una adecuada fertilización por parte del espermatozoide capacitado.

018: EFICACIA DE LA ESTIMULACIÓN NATURAL EN PACIENTES CON BAJA RESPUESTA

V. García-Laez, J. Zulategui, J. M. de los Santos, P. Gámiz, M. Meseguer, C. Albert, M. J. de los Santos.
IVI Valencia (Valencia)

INTRODUCCIÓN:

La baja respuesta a la FSH es, en muchas ocasiones, reflejo de una disminución de la reserva ovárica que se exagera con la edad pero que también puede ocurrir en mujeres jóvenes. La falta de sensibilidad de los receptores de FSH, así como una disminución de éstos en las células de la granulosa podría explicar parcialmente esta situación clínica.

OBJETIVO:

El objetivo de este estudio es analizar qué ambiente hormonal folicular se consigue en pacientes con baja respuesta en ciclos naturales y compararlas con el conseguido en situaciones de estimulación ovárica convencional (EOC) en las que los folículos son sometidos a elevadas dosis de FSH en la fase folicular, con el fin de arrojar algunas luces acerca del manejo clínico de estas pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio prospectivo de cohortes emparejado que incluye un total de 68 pacientes 42 fueron ciclos naturales (CN) y 26 ciclos de estimulación ovárica controlada. La edad media fue de 36 ± 3.5 años. Mediante la punción ovárica, el líquido folicular del único folículo preovulatorio de los ciclos naturales y el líquido de uno de los folículos dominantes de los ciclos estimulados

fueron aspirados, centrifugados, alícuotados y almacenados a -80 C hasta su utilización.

Se midieron las siguientes hormonas: FSH, LH, androstendiona, testosterona, progesterona y estradiol mediante enzoinmunoanálisis (MEIA). Los ovocitos asociados a los folículos estudiados se analizaron mediante Oosight™ para valorar el estado del huso meiótico (posición y estructura) así como los valores medios de birrefringencia y fecundación. Los análisis estadísticos utilizados fueron pruebas Chi Cuadrado para la comparación de las variables categóricas, t- Student para la comparación de las medias y regresión logística lineal con el 95 % de intervalo de confianza para estudiar la asociación entre los valores hormonales del ambiente folicular y los valores de birrefringencia del huso.

RESULTADOS:

Los resultados del ambiente folicular vienen resumidos en la siguiente tabla:

	Ratio LH/FSH	P4	Androstendiona	Testosterona	I:2
CN	2.4*	8833 ng/ml	54.2 ng/ml	5.5 ng/ml	375.436pg/ml
EOC	0.5*	10202 ng/ml	17.7 ng/ml	7.8 ng/ml	369.103 pg/ml

*p<0.05

Aunque no se encontró una mejora en cuanto al porcentaje de husos bien

posicionados y estructurados entre CN y EOC (42.9% versus 46.9%), ni en la media de birrefringencia de los husos observados (1.5 versus 1.4), ni en el porcentaje de ovocitos fecundados (73,7% versus 55.6%) respectivamente, en general se encontró una correlación positiva (R=0.4, p<0.04) entre la ratio LH/FSH y la birrefringencia de los husos meióticos.

CONCLUSIONES:

La elevación de las dosis de gonadotropinas en la estimulación, no indujo cambios a nivel androgénico ni estrogénico en los folículos dominantes a pesar de la disminución de la ratio LH/FSH intrafolicular observada en los ciclos estimulados. No obstante, la existencia de una correlación positiva entre la ratio LH/FSH y los valores de birrefringencia, signo de buen pronóstico para la calidad ovocitaria, apoya la idea de los efectos beneficiosos de los ciclos naturales sobre la calidad ovocitaria en este grupo de pacientes puesto que mayores valores de ratios LH/FSH fue conseguida en la mayoría de los ciclos naturales.

019: LA DETERMINACIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO EN EL ADN DEL ESPERMATOZOIDE NO PERMITE PREDECIR GESTACIÓN EN CICLOS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL INTRAUTERINA.

C. Aguilar, M. Meseguer, S. García-Herrero, L. Romany, J. Remohi, N. Garrido.

Instituto Valenciano de Infertilidad, Instituto Universitario IVI, Universidad de Valencia, Centro de investigaciones Científicas Príncipe Felipe. Valencia.

INTRODUCCIÓN:

La eficiencia de la reproducción en el varón depende de la integridad del ADN espermático. En trabajos anteriores de nuestro grupo, sabemos que el espermatozoide en varones infértiles posee mayor fragmentación y oxidación del ADN, causado por la presencia de especies reactivas del oxígeno que en varones fértiles y que en distinto grado, afectan la calidad embrionaria y el éxito reproductivo.

El objetivo de el presente estudio es analizar la oxidación del ADN en el espermatozoide en alícuotas de las muestras de semen empleadas en tratamientos de inseminación artificial intrauterina, comparando aquellas en las que se logra gestación con aquellas en las que no.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio de cohortes prospectivo, donde se analizaron espermatozoides de muestras de semen antes y después de su capacitación por swim-up ($n=100$), de tratamientos de inseminación artificial,

utilizando el kit OXIDNA y mediante citometría de flujo. Se crearon las ventanas correspondientes para analizar la oxidación del ADN, y se realizaron análisis estadísticos de regresión logística de la media de oxidación del ADN por célula y % de células oxidadas en cada muestra con la consecución de la gestación, controlando por edad, etiología femenina, calidad del semen, y protocolos de estimulación ovárica. Finalmente, se realizaron curvas ROC para determinar el valor pronóstico de la prueba.

RESULTADOS:

No se confirma ninguna relación ni del % de espermatozoides con el ADN oxidado ni de la media de oxidación por célula y el logro de gestación, con una odds ratio $OR=0,997$, y un intervalo de confianza IC 95% $0,929-1,071$, y $0,936$ IC 95% $0,867-1,009$, respectivamente con el análisis de los espermatozoides en el eyaculado.

Tras el swim up, similares resultados fueron obtenidos, $OR=1,003$ IC 95% $(0,909-1,107)$ y $OR=0,953$ IC 95%

$(0,873-1,041)$, respectivamente el % de espermatozoides con ADN oxidado y la media de oxidación por célula.

El análisis con curvas ROC curves confirmó la ausencia de poder predictivo de la oxidación de ADN en el espermatozoide con la consecución de gestación con un valor del área bajo la curva de $AUC 0,432$ 95% IC $(0,135-0,729)$ para semen fresco del % de células positivas para la oxidación, y $AUC=0,222$ 95% CI $0,030-0,415$ para la media de oxidación por célula. Resultados semejantes se obtuvieron tras la preparación del semen, $AUC=0,519$ 95% IC $0,291-0,746$, y $AUC=0,389$ 95%CI $0,150-0,628$, respectivamente.

CONCLUSIONES:

Según nuestros resultados, la oxidación del ADN no posee valor predictivo para la gestación en tratamientos de inseminación artificial intrauterina. A pesar de constatar un grado de oxidación del ADN celular variable, no tiene repercusión en las posibilidades de lograr un embarazo en inseminación.

020: LA TRANSFERENCIA DE UN EMBRIÓN ELECTIVO EN DÍA 3 SEGUIDO DE UN CICLO DE VITRIFICACIÓN/DESVITRIFICACIÓN MEJORA LA TASA DE EMBARAZO RESPECTO A LA TRANSFERENCIA DE DOS EMBRIONES; ESTUDIO PROSPECTIVO DE COHORTES EMPAREJADAS

A. Galán, M. Meseguer, C. Albert, A. Cobo, M. J. de los Santos

IVI Valencia

INTRODUCCIÓN:

La alta tasa de embarazos múltiples obtenida con las técnicas de reproducción asistida es un fenómeno

preocupante por asociarse con un aumento de la morbi-mortalidad perinatal. Para reducir la tasa de gestación múltiple la transferencia de un único embrión electivo es la solución,

pero debe acompañarse de la capacidad de crioconservar eficientemente los embriones sobrantes para obtener una cierta equivalencia con la transferencia de dos embriones.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio preliminar prospectivo de cohortes emparejadas realizado con 88 pacientes sometidas a FIV-ICSI en nuestro centro. Cuarenta y cuatro de ellas recibieron un solo embrión en 74 transferencias (embriones en fresco y criopreservados). El grupo control se eligió seleccionando por emparejamiento 44 pacientes con transferencia de dos embriones el mismo día, el anterior o el siguiente que las pacientes incluidas en el estudio. Las pacientes de ambos grupos tenían ≤ 37 años (media=34,14 años), tenían al menos 2 embriones de buena calidad en D3 (6-8 células, menos de 10% de fragmentación y blastómeras simétricas) 72 horas post inseminación. Los embriones sobrantes de buena calidad se vitrificaron usando el método Cryotop®. La tasa de gestación evolutiva acumulada en el grupo de transfer único tras 1, 2 ó 3 embriones transferidos (1 en fresco y 1 ó 2 desvitrificados) se compara con la tasa de gestación evolutiva en el

grupo de transfer doble. La tasa de gestación evolutiva se expresa junto con el intervalo de confianza 95% (IC95).

RESULTADOS:

Realizamos 74 ciclos de transfer único tras FIV-ICSI. De los 44 realizados en fresco, 33 dieron resultado positivo de Beta-hCG, 4 de ellos fueron embarazos bioquímicos (12,1%) y 6 abortos clínicos (18,2 %). La tasa de gestación evolutiva es del 52,3 % (23/44) (IC95 37,5-67,1%). 19 pacientes (43%) se sometieron a un primer transfer de vitrificados, 8 quedaron gestantes (1 embarazo bioquímico, 2 abortos clínicos); 7 pacientes se realizaron un 2º criotransfer en los que conseguimos 2 embarazos más. La tasa acumulada de gestación alcanza así el 86,6%, siendo la tasa de embarazo evolutivo 75,0 % (33/44) (CI95 59,6-85,9%). Todos los embarazos son únicos. De las 44 pacientes del grupo control (transfer de dos), 26 tuvieron resultado positivo en

el test de embarazo, 2 fueron embarazos bioquímicos (7,7%) y 4 sufrieron aborto clínico (15,4 %), con lo que la tasa de gestación evolutiva resulta en un 4,6 % (20/44) (CI95 30,7-59,1%). Nueve pacientes (45 %) tienen embarazos múltiples (CI95 23,2-6,0%).

CONCLUSIONES:

La vitrificación de embriones con el método Cryotop ha mejorado las tasas de supervivencia post desvitrificación. Por consiguiente, la transferencia única de embriones seguida de la vitrificación/desvitrificación en los ciclos sin éxito proporciona tasas de gestación acumulada y total significativamente mayores (como demuestran los IC95) que las transferencias de dos embriones. Mediante esta estrategia estamos aumentando el éxito reproductivo y además eliminamos la incidencia de gestaciones múltiples.

021: REVISIÓN DE LA EXPERIENCIA CLÍNICA EN CRIOPRESERVACIÓN DE TEJIDO OVÁRICO EN LA UNIDAD DE REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA FE DE VALENCIA.

C. C. Duque, M. Romeu, J. M. Rubio, A. Monzó, A. Romeu.

Unidad de Reproducción Humana (Servicio de Ginecología). Hospital Universitario la Fe de Valencia.

INTRODUCCIÓN:

La criopreservación de tejido ovárico es una opción para mantener la función reproductiva y endocrina en pacientes oncológicas, cuyo tratamiento (quimio/radioterápico) supondrá un riesgo importante de Fallo Ovárico Prematuro (FOP). Consiste en la preservación de fragmentos (o la totalidad) de la corteza ovárica previa al tratamiento, aislando al tejido de la agresión gonadotóxica.

MATERIAL Y MÉTODOS:

En la criopreservación de tejido ovárico participan los Servicios de Ginecología (Unidad de Reproducción Humana) y Anatomía Patológica del Hospital

Universitario la Fe de Valencia, así como el Centro de Tejidos de la Comunidad Valenciana. En nuestro protocolo se incluyen mujeres con edad entre 13 y 35 años, afectas de enfermedades benignas o malignas cuyo tratamiento pudiera producir, como efecto secundario, un FOP. Se excluyen aquéllas que presentan contraindicaciones para la intervención quirúrgica o en las que el autotransplante ovárico pudiera suponer la reactivación de la enfermedad neoplásica. La obtención del tejido ovárico (exéresis ovárica) se realizó mediante laparoscopia. La disección de la cortical ovárica se realizó en láminas de un grosor de 1-2mm y tamaño 5x7mm aproximadamente. Un fragmento fue remitido al Servicio de Anatomía Patológica para verificar la

normalidad histológica (presencia de folículos primordiales y ausencia de células malignas) y el resto fueron enviados al Centro de Tejidos de la Comunidad Valenciana para su congelación (DMSO 10-12,5%; congelador programable; -0,3 y 0,5°C/min). Las pacientes fueron citadas a los 6, 12 y 24 meses del proceso quirúrgico para evaluar la función ovárica residual mediante Recuento de Folículos Antrales (RFA) y determinación hormonal (FSH, LH, Estradiol, Inhibina y AMH).

RESULTADOS:

Durante el periodo de Marzo de 2008 a Mayo de 2009 se realizaron 12 criopreservaciones de corteza ovárica. La edad media de las pacientes fue de 25

años (13-35). El motivo de la criopreservación fue por linfoma de Hodgkin en 4 casos (33%), linfoma no Hodgkin en 1 caso (8,3%), neoplasia de mama en 3 casos (25%), sarcoma de glúteo en 1 caso (8,3%), esclerosis múltiple con tratamiento quimioterápico en 1 caso (8,3%), sarcoma de tibia en 1 caso (8,3%) y carcinoma de cérvix en 1 caso (8,3%). De las 12 pacientes, 2 (16,6%), bajo supervisión oncológica, comenzaron con el tratamiento quimio/radioterápico antes de la criopreservación ovárica con el fin de minimizar la posibilidad de metástasis. En 6 pacientes (50%) no pudieron realizarse los controles ecográficos y determinaciones hormonales (salvo AMH) previas al proceso quirúrgico por

premura en la intervención. La duración media de las intervenciones fue de 44 minutos y las pacientes permanecieron una media de 24 horas ingresadas. En el 75% de los casos (9/12) se realizó la exéresis del ovario izquierdo. El tiempo de isquemia, definido como el tiempo transcurrido desde la extracción ovárica hasta su criopreservación fue inferior de 4 horas. En el 91,6% (11/12) de los casos los fragmentos remitidos a Anatomía Patológica presentaron folículos primordiales y ausencia de células malignas; solamente en un caso (linfoma no Hodgkin) la criopreservación no pudo llevarse a cabo por presencia de infiltración de células linfoides en el tejido estudiado. Cuando el tratamiento oncológico lo permite se

ofrece la posibilidad de vitrificar ovocitos/embriones antes de la exéresis ovárica. Dos pacientes han sido incluidas en este protocolo, una con vitrificación de ovocitos y otra de embriones. Hasta el momento no ha sido solicitado ningún autotransplante por parte de las pacientes.

CONCLUSIONES:

A pesar de que la criopreservación de tejido ovárico no es una práctica consolidada para mantener la función reproductora y endocrina en pacientes oncológicas, los resultados obtenidos, tanto en modelos experimentales como en las experiencias recientes en la especie humana, ofrecen nuevas opciones en

O22: VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS EN PACIENTES CON SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA: RESULTADOS IVI MADRID 2008

L. Herrero, C. Losada, S. Pareja, J. Fernández, M. Jiménez, Y. Mínguez.

IVI MADRID

INTRODUCCIÓN:

La hiperestimulación ovárica es una complicación derivada de la alta respuesta de algunas pacientes a las gondonadotropinas. Estas pacientes presentan bajas tasas de gestación e implantación, y además aquellas que consiguen un embarazo corren el riesgo de desarrollar síndrome de hiperestimulación tardío. Una estrategia novedosa y eficaz en pacientes con riesgo de hiperestimulación podría ser la vitrificación de los ovocitos con el fin de transferir los embriones resultantes en un ciclo posterior.

El objetivo de este trabajo es presentar las tasas de gestación conseguidas tras la transferencia de embriones procedentes de ovocitos vitrificados en este tipo de pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Las pacientes incluidas en este estudio fueron clasificadas como "pacientes con riesgo de hiperestimulación" cuando el nivel de estradiol en sangre fue >4000 pg/ml y/o se contaban >15 folículos maduros en la última ecografía transvaginal.

Durante el 2008, 94 de estas pacientes vitrificaron sus ovocitos maduros siguiendo el método del Cryotop (Kitazato). Posteriormente, en 38 de estas pacientes se procedió a la desvitrificación de sus ovocitos para llevar a cabo un ciclo de microinyección y transferencia embrionaria. Los embriones resultantes fueron transferidos en ciclos sustituidos posteriores al ciclo de vitrificación.

RESULTADOS:

Los resultados, totales y por grupos de edad, obtenidos tras la desvitrificación de los ovocitos de estas pacientes son los siguientes:

CONCLUSIONES:

Las tasas de gestación e implantación obtenidas tras la desvitrificación y transferencia de embriones en estas pacientes confirman que la vitrificación de ovocitos es una opción segura y eficaz en pacientes con riesgo de hiperestimulación ovárica.

	Total	≥38	<38
Nº de pacientes	38	3	35
Edad (media ± DE)	33.3±3.3	39.3±1.5	32.8±3.3
Ovocitos vitrificados (N, media ± DE)	636 16.7 5	43 14.3 3.2	593 16.9 5.1
Ovocitos desvitrificados (N, media ± DE)	478 12.6 4.9	28 9.3 3.5	450 12.9 5
Nº de ovocitos que sobreviven y %	396 82.8	18 64.3	378 84.0
Nº Transferencias	36	3	33
Media de embriones transferidos (media ± DE)	2 0.6 23/36	2.3 0.7 1/3	2.2 0.6 22/33
Nº Gestaciones bioquímicas y %	63.8 19/36	33.3 1/3	66.6 18/33
Nº Gestaciones clínicas y %	52.7 15/36	33.3 1/3	54.5 14/33
Nº de gestaciones evolutivas y %	41.6 4/19	33.3 0	42.4 4/18
Nº abortos y %	21.0 4/19	0 0	22.2 4/18
Nº de embriones implantados y %	32.5 25/77	14.3 1/7	34.3 24/70

023: VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS: NUESTRA EXPERIENCIA.

J. Muñoz, G. Quea, E. Garijo, F. Galera, J. Herreros.
Instituto Madrileño de Fertilidad (IMF), Madrid

INTRODUCCIÓN:

La vitrificación es una nueva técnica de criopreservación de reciente implantación en los laboratorios de reproducción asistida de nuestro país. Esta técnica ha permitido criopreservar embriones, blastocistos y ovocitos. La criopreservación de ovocitos anteriormente tenía muy bajo rendimiento por lo que no se podía implementar de rutina en los laboratorios hasta la llegada de la vitrificación.

El objetivo de este trabajo es presentar las tasas de gestación conseguidas tras la transferencia de embriones procedentes de ovocitos vitrificados.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Desde que obtuvimos la acreditación para poder vitrificar ovocitos (en Junio de 2008), un total de 65 pacientes de ovocitos propios (no donantes) han usado esta técnica para criopreservar sus ovocitos en nuestro centro. La razón por la que estas pacientes vitrificaron parte o la totalidad de sus ovocitos fue diversa: riesgo de hiperestimulación, razones éticas a la hora de criopreservar embriones, problemas en la recogida de la muestra

de semen, postergar la maternidad...

La vitrificación se realizó por el método del Cryotop (Kitazato biopharma, Japon). A las 2 horas de la captación ovocitaria se procedió a decumular los ovocitos. Seguidamente los ovocitos maduros (MII) fueron vitrificados siguiendo las instrucciones del fabricante y almacenados en tanques de

Francia). El embarazo se confirmó mediante -hCG en suero a los 12 días de la transferencia y la presencia de saco gestacional 10 días mas tarde.

RESULTADOS:

Hasta el momento 30 pacientes con una edad media de 36.9 años han desvitrificado algunos de sus ovocitos:

Nº de casos	30
Nº de ovocitos (media±SD)	124 (4.1±1.5)
Nº de ovocitos que sobreviven (media±SD) (%)	102 (3.4+1.05) (82.2 %)
Nº de ovocitos fecundados (media±SD) (%)	84 (2.8+0.9) (82.3 %)
Nº de embriones A+B (media±SD)	60 (2.0+0.75)
Nº de embriones transferidos (media±SD)	66 (2.2±0.86)
Nº de embriones re-vitrificados	6
% de Gestación Clínica	40 % (12/30)
% Implantación	19.7 % (13/66)

nitrogeno liquido.

La desvitrificación se hizo según protocolo y 2 horas después de la misma se procedió a microinyectar los ovocitos. La fecundación se observó a las 16-19 horas post-inyección y al tercer día de la desvitrificación-microinyección se realizó la transferencia embrionaria con el catéter TDT (Laboratoire CCD,

CONCLUSIONES:

A la vista de los resultados preliminares parece que la vitrificación de ovocitos es una técnica segura y eficaz, consiguiendo tasas de embarazo equiparables a las que se consiguen con ovocitos en fresco.

024: EL CIGARRILLO AUMENTA LOS NIVELES DE COLESTEROL EN EL PLASMA SEMINAL Y REDUCE SIGNIFICATIVAMENTE EL CALCIO INTRACELULAR EN ESPERMATOZOIDES DE HOMBRES INFÉRTILES

T. Vilorio, N. Garrido, J. A. Martínez-Conejero, J. M. De Los Santos, P. Gámiz, M. Meseguer.
IVI-Valencia

INTRODUCCIÓN:

El consumo de cigarrillos es uno de los hábitos tóxicos más comunes en la población; éste, es potencialmente capaz de inducir efectos deletéreos en los gametos y además ha sido asociado con un aumento del estrés oxidativo en el eyaculado. Nuestro grupo

previamente ha demostrado que el hábito de fumar afecta negativamente algunas enzimas antioxidantes intracelulares como la GPx4 (isoforma específica del espermatozoide), alterando su actividad y expresión de ARNm, probablemente produciendo peroxidación lipídica de la membrana espermática y afectando la calidad

seminal, pero no así, daño oxidativo al ADN (origen primario de la fragmentación del ADN). Debido a ello, resulta interesante estudiar otros cambios moleculares en el espermatozoide. Adicionalmente, hemos demostrado que las concentraciones intracelulares de calcio (Ca²⁺) y la proporción del colesterol

(CH) en la membrana del espermatozoide son marcadores importantes de calidad seminal debido a su relación directa con la morfología y el potencial de fertilidad; por otro lado, la actividad mitocondrial (AM) se ha visto fuertemente relacionada con la movilidad espermática. Nuestro objetivo con este estudio fue correlacionar niveles de Ca+2, CH y AM en el espermatozoide, con el consumo de tabaco en pacientes infértiles.

MATERIAL Y METODOS:

Estudiamos 135 muestras de semen de hombres infértiles. Los pacientes que hubieran consumido alcohol y/o drogas en los 3 meses previos al estudio fueron descartados. Así mismo, fueron excluidos aquellos pacientes que tuvieran una historia reciente de fiebre, exposición a gonadotoxinas como quimioterapia, radioterapia, pesticidas, o exposición ocupacional a metales pesados. También se investigó sobre la presencia de varicocele, torsión testicular, y cualquier otra alteración en el tracto genito-urinario, y todos fueron excluidos. Establecimos dos grupos

según el consumo de cigarrillo: no fumadores (n=73) y fumadores (n=62). Analizamos los parámetros seminales básicos según los criterios de la OMS; las concentraciones de Ca+2 y CH en el plasma seminal fueron determinadas por enzimoimmunoanálisis. El Ca+2 intracelular, las concentraciones de CH en la membrana de espermatozoide y la AM, fueron determinados por fluorometría. El análisis estadístico fue realizado utilizando la prueba T para detectar diferencias significativas.

RESULTADOS:

No se encontró ninguna correlación entre los parámetros seminales básicos y el consumo de cigarrillo. La concentración de CH en el plasma seminal de los hombres fumadores fue más alta (27.40 [ET 6.82]) que en los no fumadores (13.78 [ET 2.70]) (p=0.044). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de CH en la membrana plasmática del espermatozoide entre fumadores y no fumadores. Las concentraciones de Ca+2 en el plasma seminal fue comparable en los dos

grupos, pero el Ca+2 intracelular en la membrana espermática resultó considerablemente disminuido en el grupo de hombres fumadores (3.44 [ET 1.41]) comparado con no fumadores (12.23 [ET 4.22]) (p=0.030). La actividad mitocondrial presente en fumadores y no fumadores no resultó importante.

CONCLUSIONES:

Hemos observado un aumento significativo de niveles de CH en el plasma seminal de los hombres fumadores (así como se ha descrito en sangre); pero no en la membrana espermática; probablemente preservando la función de capacitación en la cual ve implicado el CH. También hemos demostrado que fumar afecta negativamente el Ca+2 intracelular en el espermatozoide, y este fenómeno podría producir cambios importantes en la fisiología celular de los gametos de hombres fumadores, aunque su actividad mitocondrial no se vea alterada. Por tanto, es necesaria investigación adicional para estudiar los efectos negativos del cigarrillo en los espermatozoides.

025: COMPARACIÓN ENTRE EL TEST DE FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO MEDIANTE LA TÉCNICA DE SCD Y EL ÍNDICE DE VITALIDAD MEDIDA CON EL TEST DE NARANJA DE ACRIDINA.

E. Olaya, L. Ortega, P. López, A. Gabriel, I. Orozco, R. Núñez, P. Caballero
Clínica Tambre, Madrid

INTRODUCCIÓN:

La integridad del ADN espermático es uno de los factores más importantes que se analizan actualmente en el estudio de fertilidad masculina.

Existen numerosas publicaciones sobre la utilidad de diversos métodos en los cuales se analiza el estado de la cromatina espermática. Uno de lo más sencillos es el test de bromuro de etidio y naranja de acridina (AO), con el cual se comprueba el grado de desnaturalización del ADN espermático en función de su unión al colorante naranja de acridina. Sin embargo, la

técnica de AO está limitada a estas propiedades metacromáticas, por cuanto nos aporta información limitada del estatus nuclear del espermatozoide.

Otras técnicas, como el Sperm Chromatin Dispersión (SCD) analizan la fragmentación del ADN espermático comprobando roturas en la cadena.

El objetivo de este trabajo es comprobar si existen relación entre el grado de fragmentación de ADN y la vitalidad espermáticas en muestras de semen de varones en estudio de fertilidad.

MATERIAL Y METODOS:

Para el estudio se han incluido 82 muestras de semen de varones en estudio de fertilidad en la Clínica Tambre.

Para el estudio de la vitalidad se ha empleado el test de Bromuro de etidio y naranja de acridina y para la fragmentación espermática el test Halosperm.

La técnica de AO detecta la proporción de espermatozoides muertos dependiendo del grado de desnaturalización del ADN nuclear.

Espermatozoides con fluorescencia naranja indican un ADN desnaturalizado, mientras que los que presentan fluorescencia verde contienen el ADN intacto.

El porcentaje de fragmentación se midió mediante el test SCD mejorado (Halosperm). Este test nos indica la presencia de roturas de la cadena de ADN basándonos en el tamaño del halo obtenido. En un espermatozoide fragmentado no observamos este halo al analizar la muestra con microscopio de fluorescencia y el fluorocromo GelRed y por el contrario en un espermatozoide con el DNA no fragmentado presenta un halo mayor.

Se utilizó T de Student para comparación estática de medias entre ambos grupos. Se ha considerado como significativo $p < 0,05$

RESULTADOS:

La proporción de espermatozoides con DNA desnaturalizado detectado con el test de AO se correlacionó significativamente con la proporción de espermatozoides con DNA fragmentado, detectado con el test SCD ($r = 0.84$, $P < 0.001$). El valor medio del índice de vitalidad con AO fue de 21,1% (6 ± 50) frente al 21,9% ($7,3 \pm 40$) de fragmentación en las 82 muestras analizadas. Por otra parte, los dos

ensayos mostraron una correlación estadísticamente negativa con la concentración espermática, movilidad y morfología normal.

CONCLUSIONES:

Este estudio demuestra la correlación entre los resultados de vitalidad espermática medida con el test de naranja de acridina y el grado de fragmentación de ADN con el SCD. Estos resultados sugieren que podría utilizarse el test de AO como primera opción para determinar el daño espermático a nivel de la cromatina antes de la realización de test más costosos o complicados.

026: ANÁLISIS FENOTÍPICO DE PROSTASOMAS HUMANOS EN RELACIÓN CON SU PAPEL INMUNOMODULADOR

M. C. Guarnizo¹, E. Delgado¹, J. De Julián¹, R. G. Roncero², S. Morgado², B. Sánchez-Correa², J. J. Gordillo², R. Tarazona², J. G. Casado²
¹Norba, Ginecología y Reproducción S.L., Cáceres. ²Universidad de Extremadura, Área de Inmunología, Universidad de Extremadura, Cáceres.

INTRODUCCIÓN:

Los prostasomas son pequeñas vesículas secretadas por la glándula prostática al líquido seminal. Los prostasomas se fusionan al espermatozoide transfiriendo al espermatozoide iones, lípidos y proteínas de superficie que mejoran su movilidad, licuefacción y capacitación. El descenso de pH en la vagina (pH=5) incrementa la fusión permitiendo así la adquisición de nuevas proteínas que protegen al espermatozoide de las defensas inmunitarias en el tracto genital femenino.

Las células NK uterinas son la principal población de leucocitos en el tracto genital y juegan un papel importante en la defensa inmunológica. Sin embargo una elevada actividad de las células NK está asociada a una pérdida recurrente del embarazo.

En este trabajo planteamos la siguiente hipótesis: "los prostasomas modulan la función efectora de las células NK a través de ligandos de receptores NK". Para confirmar esta hipótesis, hemos

caracterizado fenotípicamente la expresión de ligandos moduladores de la actividad NK en los prostasomas así como las implicaciones funcionales de esta interacción.

Los prostasomas en pacientes normozoospermicos (según los criterios de la OMS) se aislaron por ultracentrifugación y cromatografía en columnas de SEPHADEX G-200 y se analizaron fenotípicamente por citometría de flujo después del acoplamiento con microsferas de carboxilato (polybead carboxylate®). Nuestros resultados demuestran que los prostasomas expresan las proteínas vesiculares de membrana CD107a/b (LAMP-1/2) y HSP-70 (proteína de choque térmico). En cuanto a los ligandos de receptores NK, expresan altos niveles de CD48 (ligando del receptor activador CD244 de células NK y células T) y CD86 (ligando de la molécula coestimuladora CD28 en células T y ligando de variantes de CD28 en células NK).

Las consecuencias funcionales de la interacción de células NK con prostasomas se determinaron mediante

la incubación de linfocitos de sangre periférica con prostasomas purificados. Tras 5 días de cultivo, se analizó la proliferación celular y los porcentajes de viabilidad, necrosis y apoptosis mediante una tinción con anexina-V/ioduro de propidio. Los resultados demostraron que los prostasomas purificados disminuyen la proliferación y la viabilidad celular aumentando el porcentaje de células apoptóticas.

En conclusión, los resultados obtenidos in vitro apoyan el papel de los prostasomas en la inmunomodulación de la actividad NK que podría estar implicado en el éxito reproductivo.

AGRADECIMIENTOS:

Este trabajo ha sido realizado gracias a las ayudas PDT08A015, GRU08077, (INPATT) de la Junta de Extremadura, cofinanciado por European Regional Development Fund (FEDER) y Ayudas a los Grupos de Investigación de la Universidad de Extremadura PPRU08J2.

027: POTENCIAL DE IMPLANTACIÓN DE LOS EMBRIONES EN FUNCIÓN DEL TAMAÑO RELATIVO DE SUS BLASTÓMEROS Y LA PRESENCIA DE NÚCLEOS VISIBLES EN CADA CÉLULA

F. Prados, G. Pérez-Bermejo, A. Díaz, Ó. Collado, M. Sánchez-Rivera, I. Bruna
Unidad de Reproducción. Hospital Universitario Madrid-Montepríncipe. Madrid.

INTRODUCCIÓN:

Estudiar la influencia de dos características morfológicas embrionarias sobre la probabilidad de implantación de un embrión. Por un lado el hecho de ver todos los núcleos, por otro, la simetría de los embriones en estadio de 4 células.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Casos de FIV realizados a pacientes menores de 39 años entre enero de 2005 y abril de 2009. Todos los embriones incluidos en el estudio tenían 4 células y $\leq 25\%$ de fragmentación en día 2 y no presentaban blastómeros multinucleados.

RESULTADOS:

De los 2895 embriones en los que se evaluaron correctamente ambas características, se vieron todos los núcleos en un 70,3% y hubo un 81% de embriones con simetría adecuada entre los blastómeros. Un 61,5% del total se clasificaron como de buena simetría y se vieron los 4 núcleos. En un 8,8% de los casos se vieron los 4 núcleos pero la simetría fue mala. En un 19,4% la simetría fue buena pero no se vieron los 4 núcleos y en un 10,2% de los embriones no se vieron los 4 núcleos y la simetría fue inadecuada.

La tasa de implantación de los embriones con buena simetría fue 39,4% (364/923), mientras que la de los de mala simetría fue: 33,0% (32/97) ($p=0,22$). La tasa de implantación de los embriones con todos los núcleos visibles fue 40,9% (315/770) y la de los que no se vieron los 4 núcleos 29,7% (65/219) ($p<0,01$).

La tasa de implantación de los embriones con buena simetría pero sin 4 núcleos visibles fue 35,7% (75/210) y la de los embriones con mala simetría pero con los 4 núcleos visibles: 45,5% (20/44). La tasa de implantación de los embriones con buena simetría y 4 núcleos visibles en día 2 fue del 39,7% (278/700), mientras que la de los embriones con mala simetría y no todos los núcleos visibles en día 2 fue: 21,3% (10/47) ($p<0,02$).

CONCLUSIONES:

Hemos analizado embriones con 4 células en día 2, sin multinucleación y con bajo grado de fragmentación obtenidos a partir de oocitos de pacientes menores de 39 años. Los que presentan blastómeros semejantes muestran mejor tasa de implantación que los que muestran mala simetría,

aunque la diferencia no es significativa. Los embriones en los que se pudieron observar los 4 núcleos muestran significativamente mejor tasa de implantación que aquellos en que no se vieron los 4 núcleos. Los embriones con blastómeros semejantes y los 4 núcleos visibles presentan claramente mayor tasa de implantación que aquellos en los que las células son de diferente tamaño y no todas permiten detectar su núcleo. Además, si comparamos los embriones con una de las dos características en su versión más positiva y la otra en versión más negativa, obtenemos una ligera diferencia en tasa de implantación (no estadísticamente significativa) favorable a la presencia de núcleo en las 4 células frente a blastómeros de tamaño semejante. Los resultados apuntan a que ambas características estudiadas de manera aislada tienen influencia sobre la tasa de implantación. La observación o no de los 4 núcleos de embriones con 4 células en día 2 parece tener más relevancia que la semejanza en el tamaño de los blastómeros. Los embriones con 4 células mononucleadas y de tamaño semejante en día 2 presentan mucha mejor tasa de implantación que los embriones con células de tamaño diferente en que no se detectaron los 4 núcleos en sus 4 células.

028: COMPARACIÓN DE LAS TASAS DE SUPERVIVENCIA EMBRIONARIAS EN LOS CICLOS DE VITRIFICACIÓN VERSUS CONGELACIÓN LENTA

M. Sanchez de Burgos, L. Andrés Criado, M. Nieto Sánchez, J. Cuadros, E. Hernández
Clínica FIVMadrid

INTRODUCCIÓN:

La congelación de embriones desempeña un papel muy importante en las técnicas de reproducción asistida. Actualmente, a las técnicas de congelación lenta hay que añadir una

nueva técnica, la vitrificación. Mientras que la congelación tradicional enfría de forma lenta y progresiva los embriones, la vitrificación baja la temperatura de forma brusca. Debido a este enfriamiento tan rápido, y a la alta concentración de crioprotectores en el

medio utilizado para la vitrificación, se evita la formación de cristales dentro de la célula, lo cual podría ocurrir con la congelación lenta, provocando, de este modo, que los embriones se dañen y pierdan capacidad de implantar. El objetivo de este estudio es comparar la

supervivencia embrionaria de la descongelación, comparando las dos técnicas posibles: Congelación lenta y Vitriificación.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio prospectivo y randomizado realizado en la clínica FIVMadrid desde Diciembre de 2008 hasta Abril de 2009. Las técnicas de congelación utilizadas fueron la tradicional lenta con descenso controlado de la temperatura y la vitriificación mediante el Cryotop. En cada paciente se seleccionó una u otra técnica mediante el programa de aleatorización Research Randomizer Form v4.0.

Se llevaron a cabo un total de 75 ciclos de descongelación tradicional vs 34 de desvitriificación. De los 75 ciclos de descongelación tradicional no hubo transferencia en 2 de los casos, mientras que de los 34 ciclos de desvitriificación no hubo transferencia en 1 caso. Todos los embriones se mantuvieron en cultivo 24 horas postdescongelación para observar su desarrollo antes de transferir.

RESULTADOS:

	Embriones descongelados	Embriones con 100% células (intactos)	Embriones con 50%-100% células	Embriones con <50% células	lisados
Descongelación	94	28 (29,7%) a	31 (32,9%) b	19 (20,2%)	16(17,0%)
Desvitriificación	63	42 (66,7%)a	15 (23,8%) b	2 (3,1%)	4 (6,3%)

p<0,0001
ns

Si consideramos como supervivencia embrionaria aquellos embriones que permanecen intactos tras la descongelación y aquellos que tienen la mitad o más de sus células intactas, la supervivencia en la descongelación fue de 59/94 (62,8%) y en la desvitriificación de 57/63 (90,5%) siendo estadísticamente significativa (*p<0,001*).

De los 78 embriones procedentes de la descongelación tradicional que no se lisaron, 34 se dividieron a las 24 horas (43,6%), mientras que en los ciclos de desvitriificación de los 59 embriones que no se lisaron se dividieron un total de 43 embriones (72,9%), siendo la diferencia estadísticamente significativa (*p<0,01*).

CONCLUSIONES:

La comparación mediante el test de la chi-cuadrado de los embriones con el 100% de sus células, del total de los embriones supervivientes y de los embriones que se dividen a las 24 horas mostró diferencias estadísticamente significativas. Nuestros resultados sugieren que los embriones congelados mediante la técnica de vitriificación presentan mayores tasas de supervivencia que aquellos congelados mediante la congelación lenta, por ello en nuestro centro estamos derivando paulatinamente la congelación lenta hacia la vitriificación con el Cryotop.

029: COMPARACION ENTRE EL NÚMERO DE EMBARAZOS CLINICOS ESTIMADO Y OBTENIDO EN TRANSFERENCIAS DOBLES. EFECTO DE LA CALIDAD EMBRIONARIA

V. Moreno, F. Miró, E.Vidal, S. Cívico, J.M. Calafell, O. Sarrias, N. Brandí, M. Guimera, J. Balasch
Unitat de Reproducció Assistida. Institut Clínic de Ginecologia, Obstetrícia i Neonatologia. Hospital Clínic de Barcelona

INTRODUCCIÓN:

Transferir varios embriones aumenta la probabilidad de embarazo, aunque incrementa el riesgo de gestación múltiple. Igualmente, no todos los embriones poseen la misma calidad, y por tanto, la misma capacidad de implantar y desarrollarse. Buscando un equilibrio entre aumentar la tasa de embarazo simple y el riesgo de embarazo doble, comparamos la tasa de embarazo clínico obtenida en transferencias dobles con embriones de la misma calidad con la esperada, asumiendo que la probabilidad de embarazo clínico por embrión es un suceso independiente.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Este es un estudio retrospectivo. Embriones obtenidos por FIV son clasificados según una escala basada en simetría celular y presencia de fragmentos en cuatro tipos, I a IV, de forma decreciente. A partir de los resultados observados en transferencias de un embrión de tipo I,II,III, y IV, se estiman valores de probabilidad de embarazo doble y simple para transferencias de dos embriones. Los valores estimados son comparados con los observados mediante análisis de frecuencias con Chi-cuadrado, con corrección de continuidad para comparaciones con dos grados de libertad.

RESULTADOS:

Se considera un total de 627 de transferencias de un solo embrión y 1728 transferencias de dos embriones. Las transferencias de dos embriones incluyen, pares de embriones del mismo tipo (I a IV) y dos embriones de tipo I y III. La probabilidad de embarazo clínico obtenida en transferencias de un embrión de tipo I a IV es 15,4%, 13,9%, 11,5% y 6,3% respectivamente. La comparación entre valores observados y estimados en transferencias de dos embriones se muestran en la tabla 1.

(%)	2 x tipo I	2 x tipo II	2 x tipo III
no embarazo	48.4 v 71.6	65.3 v 74.1	68.5 v 78.3
embarazo (total)	49.4 v 28.4	34.3 v 25.9	31.5 v 21.7
un saco	33.8 v 26.3	23.5 v 23.9	24.4 v 20.4
dos sacos	15.6 v 2.4	10.8 v 1.9	7 v 1.3

Tabla 1. Comparación de los embarazos clínicos observados v estimados en transferencias dobles

En todos los casos de transferencia de dos embriones, excepto en embriones tipo IV, la tasa de embarazo doble observada es significativamente superior a la esperada ($P < 0.0001$). En transferencia doble de embriones tipo I, la tasa de embarazo simple es también superior a la esperada ($P < 0.0001$), en cambio, para tipos II, III y IV, ambos valores son similares. Cuando se transfieren conjuntamente embriones tipo I y III, la tasa de embarazo simple observada es también superior a la esperada ($P = 0.0067$).

CONCLUSIONES:

La tasa de embarazo clínico doble observada en las transferencias de dos embriones es significativamente superior a lo esperado, asumiendo que la probabilidad de obtener un embarazo por embrión es un suceso independiente. Esto es consistente con datos previamente publicados (1) y sugiere la existencia de alguna forma de interacción positiva entre los embriones transferidos.

La mayor tasa de embarazo simple observada en transferencias de dos embriones tipo I, y en transferencias de un embrión de tipo I y III no tiene una explicación clara. Estudios previos indican que la transferencia embrionaria múltiple aumenta la tasa de embarazo en casos de aborto de repetición (2). Es posible, pues, que este fenómeno esté relacionado con la producción de factores inmunológicos involucrados en implantación.

REFERENCIAS

1. Matorras R et al. Hum. Reprod. 2005; 20: 2923 – 31
2. Creus M et al. Am J Reprod Immunol 2003; 50:420-6

030: RESULTADOS DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES VITRIFICADOS PROVENIENTES DE OVOCITOS VITRIFICADOS.

S. Pareja, C. Losada, L. Herrero, J. Fernandez, M. Jimenez, C. Bou. IVI Madrid

INTRODUCCIÓN:

La criopreservación es una herramienta de uso común en cualquier laboratorio de reproducción asistida. Las técnicas de criopreservación que utilizamos a diario son mundialmente conocidas y de gran importancia, ya que un buen programa de criopreservación permite sacar el máximo rendimiento a los ciclos de fecundación in vitro, mediante la transferencia de embriones congelados. En los últimos tiempos hemos introducido en nuestros laboratorios la posibilidad de criopreservar ovocitos gracias a la vitrificación, lo que nos abre un mundo de posibilidades para nuestras pacientes.

En concreto la vitrificación de ovocitos en algunas pacientes nos permite evitar la congelación de embriones reduciendo el número de ovocitos a desvitrificar, pero aun así en algunos casos el día de la transferencia contamos con más de 2 embriones de buena calidad, y tenemos que congelarlos.

El objetivo de este estudio es mostrar los resultados preliminares que obtenemos al trasferir los embriones descongelados que provienen de ovocitos vitrificados, comparando estos resultados con los obtenidos con embriones descongelados que provienen de ovocitos en fresco.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Tanto los ovocitos como los embriones de las pacientes del grupo de estudio se han vitrificado y desvitrificado mediante el método del Cryotop (Kitazato).

Entre enero y diciembre de 2008 hemos realizado 216 ciclos de desvitrificación e ICSI de ovocitos. No están incluidos en este estudio ciclos de ovodovación. Se han realizado 181 transferencias (83,8%), de las cuales han congelado embriones 48 casos (26,5%).

RESULTADOS:

Los resultados conseguidos de estas 48 pacientes son: 29 gestaciones bioquímicas (60,9%), 24 gestaciones clínicas (52,2%) con un 32,3% de tasa

	Pacientes	Tasa Gestación Clínica	Tasa Aborto	Tasa Implantación
Transferencia de embriones desvitrificados de Ciclos de Ovocitos Desvitrificados	19	8/19 (42%)	1/8 (12,5%)	72%*
Transferencia de embriones desvitrificados de Ciclos de Ovocitos Frescos	193	60/193 (31.1%)	12/60 (20%)	22%*

* $p < 0.001$

de implantación. Las 19 pacientes que no gestaron con las transferencias en fresco, al descongelar sus embriones obtuvimos los siguientes resultados que se comparan cuando el origen de los ovocitos no es vitrificado.

CONCLUSIONES:

En nuestros ciclos de desvitrificación de

ovocitos a pesar de intentar desvitrificar el número mínimo posible para tener una buena transferencia y no tener que congelar embriones se dan casos muy buenos en los que se congelan embriones. Sin embargo en estos resultados preliminares hemos observado que los embriones descongelados procedentes de ovocitos desvitrificados presentan muy buenas

tasas de gestación e implantación. Aunque los casos que hemos descongelado son pocos todavía, nos dan confianza ante la vitrificación de los embriones y nos hacen pensar que el hecho de pasar por dos vitrificaciones no afecta a su calidad y a su potencial de implantación.

031: CAPACITACIÓN A 37° VS CAPACITACIÓN A 25°

I. Moragues, A. Brotons, A. A. Fernández-Peinado
Clínica In Vitam Centro De Medicina Reproductiva, Elche

INTRODUCCIÓN:

Prácticamente en la totalidad de los laboratorios y de forma mecánica realizamos las capacitaciones espermáticas a 37°, cuando en realidad la Tª óptima de los espermatozoides es inferior a 32°.

OBJETIVO:

Nuestro objetivo es comparar las tasas de embarazo capacitando a 37°, y a 25°.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Seleccionamos al azar dos grupos de pacientes que serán sometidos a un ciclo de Inseminación Artificial. Dentro de cada grupo de temperaturas, diferenciaremos entre Normozoospermicos, Oligozoospermicos, Astenozoospermicos, Teratozoospermicos, y Oligoastenoteratozoospermicos, Azospermicos no tenemos ningún caso, por lo que no lo tendremos en cuenta. Las capacitaciones se realizan mediante lavado con centrifugación de 10 min a 600g, y posterior Swim-up con Sperm Wash de Nikon, en el primer grupo incubamos a 37°, y en el segundo grupo a 25°.

RESULTADOS:

Nuestros resultados reflejan claramente que la tasa de embarazo en todos los grupos, en los que hemos capacitado a 25°, es significativamente superior 31%,

resultados obtenidos son buenos, podríamos mejorar las tasas de éxito incubando a 25°. Esta mejora puede ser debida a la detención de la Reacción Acrosómica que se produce a Tª ambiente, y que posteriormente se

	CAPACITACIÓN A 37°					
	NORMO	OLIGO	ASTENO	TERATO	OTA	TOTAL
NÚMERO	85	63	54	71	15	288
BETA POSITIVA	25	18	14	12	3	72
% EMBARAZOS	29%	29%	26%	17%	20%	25%
	CAPACITACIÓN A 25°					
	NORMO	OLIGO	ASTENO	TERATO	OTA	TOTAL
NÚMERO	35	32	23	13	12	115
BETA POSITIVA	12	11	7	3	3	36
% EMBARAZOS	34%	34%	30%	23%	25%	31%

frente al 25% de B-Hcg positivas que no sale capacitando a 37°.

CONCLUSIONES:

Parece ser que aún sabiendo que capacitando el semen a 37° los

reactiva en el Tracto genital femenino, puede ser que esta reactivación se produzca con mayor intensidad o simplemente que los espermatozoides incubados a 37°, vayan perdiendo con el tiempo su capacidad para realizar su función.

O32: EMBRIONES CRIOCONSERVADOS ¿QUE HACER? LA PAREJA DECIDE

M. L. García, C. Del Campo, I. Morales, P. Fuentes, M. J. Campos, V. Maldonado, M. J. Medina.
U. R. H. A. del Complejo Hospitalario de Jaén, Jaén

INTRODUCCIÓN:

La ley 14/2006, de 26 de mayo sobre técnicas de R.H.A. aclara los destinos posibles que podrán darse a los preembriones crioconservados, siendo estos: la utilización por la propia pareja, la donación con fines reproductivos, la donación con fines de investigación o el cese de su conservación sin otra utilización. En la U.R.H.A. del C.H. Jaén, incluimos en el C.I. preguntas a la pareja, que recogen los diferentes destinos de dichos preembriones.

OBJETIVOS:

Analizar porcentaje de parejas que optan por cada una de las tres opciones recogidas en la ley arriba citada, (siempre en el caso de no ser utilizados por la propia pareja), en los siguientes supuestos:

En el supuesto de no renovación de dicho consentimiento previo intento en dos ocasiones por parte del centro.

En caso de que transcurridos dos años de crioconservación, existiera desacuerdo de la pareja sobre el destino de los preembriones (por razón de separación, divorcio, etc.).

En el caso de incapacidad mental o fallecimiento de alguno de los miembros o de ambos.

Relacionar respuestas con nivel de estudios y nacionalidad, en cada uno de los tres supuestos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Revisión retrospectiva mediante base de datos informatizada (Access) procesando con el programa SPSS los datos de los C.I. obtenidos de 245 historias de parejas sometidas a ICSI, desde Mayo/06 hasta Abril/09. Datos analizados: nivel de estudios, nacionalidad en las diferentes opciones:

desacuerdo de la pareja, incapacidad mental o fallecimiento de alguno de los miembros de la pareja.

RESULTADOS:

De las 245 parejas con C.I. revisado, 97 de estas (39.6%) eligen en los tres supuestos la misma opción de las cuales 9.3% (n=9) eligen donación a otras parejas, 50.5% (n= 49) eligen donarlos para investigación, y 40.2% (n=39) de las parejas eligen la descongelación sin otra utilización..

El resto de las parejas 148 (60.4%) eligen distintas opciones según el supuesto y de estas el 89.2% (n=132) en ningún supuesto eligen descongelación, mientras que 10.8% de estas parejas (n=16) en alguno de los tres supuestos eligen la descongelación sin otra utilización.

Nivel de estudios:

Si analizamos los datos en relación con el nivel de estudios obtenemos los siguientes porcentajes:

Estudios	Donación	Investigación	Descongelación	Donación + investigación
Primarios	22.2% (2/9)	36.7% (18/49)	46.2% (18/39)	39.4% (52/132)
Medios	22.2% (2/9)	10.2% (5/49)	10.2% (4/39)	14.4% (19/132)
Universitarios	44.5% (4/9)	34.7% (17/49)	12.8% (5/39)	22.7% (30/132)
desconocidos	11.1% (1/9)	18.4% (9/49)	30.8% (12/39)	23.5% (31/132)

Nacionalidad

De las 245 parejas el 96.7% (n=237) son de nacionalidad española y 3.3% (n=8) de nacionalidad extranjera alguno o ambos miembros de la pareja.

opciones	Española (n=237)	Extranjera (n=8)
Donación	3.4% (8/237)	12.5% (1/8)
Investigación	20.7% (49/237)	0% (0/8)
Descongelación	15.6% (37/237)	25% (2/8)
Donación + investigación	53.6% (127/237)	62.5% (5/8)
Donación + investigación + descongelación	6.7% (16/237)	0% (0/8)

CONCLUSIONES:

El C.I. para criopreservación y

almacenamiento de preembriones en R.A. es más que un simple requerimiento. Es una toma de decisión informada del destino de preembriones sobrantes de un ciclo.

Son mayoría las parejas (77.5%) que optan por donación, ya sea a otras parejas o investigación, frente al 15.9% que eligen la descongelación sin otra utilización. Sólo el 6.7% de las parejas se dejan influir por los supuestos y eligen distinta opción según cada uno de ellos.

La nacionalidad no es significativa para el estudio por haber muy pocas parejas extranjeras.

Llama la atención que el 46.2% de parejas con estudios primarios eligen la descongelación, frente al 10.2% y 12.8% de las parejas con estudios medios y universitarios respectivamente.

033: RELACIÓN ENTRE LOS PATRONES PRONUCLEARES Y LA CALIDAD EMBRIONARIA SEGÚN CRITERIOS ASEBIR

M. Brossa, X. Blanch, A. Yus, M. Antich.
Fertilab, Barcelona

INTRODUCCIÓN:

La valoración exhaustiva del potencial implantatorio de los embriones obtenidos de FIV-ICSI es un tema al que dedicamos mucha atención en los laboratorios, observándolos en todos sus estadios, desde el día de la punción hasta el momento de la transferencia. En nuestro laboratorio realizamos un cultivo individualizado de los embriones, observando el patrón de pronúcleos que presentan en día 1 (ver figura 1) y su evolución y calidad (según criterios ASEBIR) hasta el día de la transferencia (día 2 o día 3). Dado que la determinación del patrón de pronúcleos conlleva un mayor tiempo de observación y, por tanto, de exposición fuera de los incubadores y, teniendo en cuenta que en otros laboratorios se observa la fecundación sin determinar el patrón de los PN observados obteniendo también muy buenos resultados, decidimos estudiar si, en nuestro centro, hallábamos una relación entre patrón pronuclear y calidad embrionaria para decidir si merecía la pena seguir con la valoración de dichos patrones.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Observamos de forma retrospectiva 1730 cigotos obtenidos en los ciclos de FIV-ICSI de nuestro centro durante el año 2008. De éstos, 741 fueron observados hasta día 2 y 989 hasta día 3.

Los patrones de pronúcleos que seguimos se muestran en la Fig.1, agrupándose en cuatro grupos (GI, GII, GIII, GIV) y la clasificación de calidades sigue la propuesta por ASEBIR (calidad A, B, C y D).

Los ovocitos maduros fueron microinyectados o inseminados. Tras la microinyección, se pasaron a microgotas de 20 microlitros de G1 plus v.5 en placas Falcon embriotesadas 60x15 para su cultivo individualizado. Los ovocitos

inseminados se pasaron a microgotas de G1 a las 3 – 5 horas post-inseminación.

Se valoraron los pronúcleos a las 18h post ICSI o post inseminación. Se pasaron a placas nuevas de G1 manteniendo su posición de cultivo. Se observó su desarrollo hasta día 2 o día 3 anotando las características de cada embrión.

RESULTADOS:

La frecuencia general de patrones pronucleares observados en nuestro laboratorio es la siguiente: 24.9% GI; 46.8% GII; 4.9% GIII; 23.4% GIV.

En embriones cultivados hasta día 2, la distribución de frecuencias de calidades observadas fue la siguiente: 37.38% calidad A; 24.70% calidad B; 15.92% calidad C; 22.00% calidad D. Para día 3, la distribución observada fue: 30.94% calidad A; 13.35% calidad B; 15.37% calidad C; 40.34% calidad D.

Sería de esperar una distribución similar de dichas frecuencias cuando se analizara conjuntamente patrón pronuclear y calidad embrionaria si ambos factores no estuvieran correlacionados. En cambio observamos una tendencia al aumento de calidad C en detrimento de la calidad A en embriones procedentes de patrón GIII. Así mismo, se observa mayor proporción de embriones de calidad A así como de buena calidad (A+B) derivados de GI, especialmente en las observaciones de día 3.

CONCLUSIONES:

Una conclusión desprendida del análisis realizado es que en día 2 se observa mayor porcentaje de embriones de buena calidad (A+B) que en día 3. Esto es debido sobretodo a embriones que, siendo de calidad óptima en día 2, no dividen o lo hacen en un grado muy bajo

(sólo una división) entre día 2 y día 3, pasando a calidad D. Con esto, nuestra elección inicial sería la de transferencia en día 3, que permite seleccionar mejor los embriones.

La tendencia observada en nuestro laboratorio muestra que el patrón pronuclear GIII tienen un peor pronóstico de calidad embrionaria. Por el contrario, la observación de GI en pronúcleos da una mayor probabilidad de embrión de buena calidad.

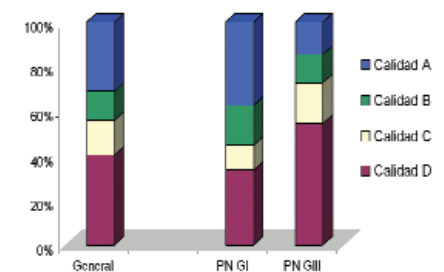


Gráfico 1: Calidad embrionaria en D+3 en función del patrón pronuclear (GI vs. GIII).

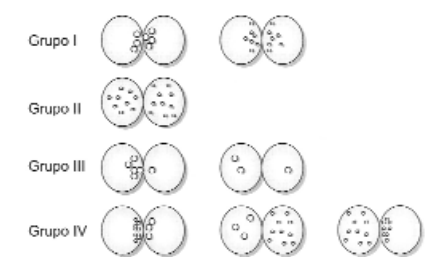


Fig.1: patrones pronucleares

034: INFLUENCIA DEL FACTOR MASCULINO SEVERO EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO

M. Cruz, B. Gadea, M. Martínez, C. Lizán, M. A. López, Y. Ayllón, I. Pérez Cano, M. Muñoz, M. Meseguer.

IVI Alicante

INTRODUCCIÓN:

En la literatura existen datos contradictorios acerca de los efectos de los espermatozoides sobre el desarrollo embrionario y principalmente sobre la formación del blastocisto.

Una herramienta útil a la hora de evaluar la influencia del factor masculino en los tratamientos y posterior resultado de un ciclo de Reproducción Asistida lo constituyen los programas de donación de ovocitos, ya que en este caso se cuenta con un parámetros de control como son los ovocitos, lo que nos permite estudiar la influencia del factor masculino.

El objetivo de nuestro trabajo es determinar el efecto del factor masculino severo en la tasa de formación de blastocisto comparando un modelo de ovodonación con un modelo de ovocitos propios.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se evaluó la tasa de formación de blastocisto de un total de 2467 embriones procedentes de ciclos de

ovodonación (Grupo A) y/o ciclos de FIV/ICSI con ovocitos propios (Grupo B). En día 5 de desarrollo, se evaluaron los embriones según la expansión del blastocelo y el número de células e integridad tanto de la masa celular interna como del trofoectodermo. Se excluyen pacientes y donantes con PCO y endometriosis. El análisis de la muestra de semen se realiza en función de los parámetros normales según los criterios de la OMS, de modo que aquellas muestras con menos de 5 millones de espermatozoides por mililitro, se definen como factor masculino severo (FMS).

El análisis estadístico incluye un test estratificado que permite comparar la variable de estudio en muestras normales y patológicas, tomando el origen de los ovocitos como variable de control.

RESULTADOS:

La tasa de desarrollo hasta blastocisto mejora en ciclos de ovodonación en comparación con los ciclos de gametos propios e incluso el factor masculino afecta menos en dicha tasa OR= 0.39 (CI95% 0.31-0.49)

Tras la aplicación del test estadístico de Mantel-Haenszel, el valor de OR referente a la tasa de desarrollo a blastocisto fue de 0,70 (CI 95% 0,67 – 0,91) $p > 0.001$; estos datos son similares a los obtenidos en las tasas globales, por lo que podemos asumir el efecto del factor masculino severo sobre el desarrollo embrionario, siendo este efecto más evidente en los ciclos con ovocitos propios.

CONCLUSIONES:

El factor masculino severo es responsable de una baja tasa de desarrollo a blastocisto pero puede ser parcialmente corregido por la calidad ovocitaria. Los ovocitos procedentes de mujeres jóvenes y fértiles contrarrestan los problemas derivados de trabajar con muestras seminales de baja calidad. Una posible explicación de este hecho reside en los mecanismos de reparación ovocitarios capaces de subsanar los errores del DNA que aparecen como consecuencia de una espermatogénesis defectuosa.

Dia 5		Bloqueados	Mórula	Blastocisto	OR	p valor
Grupo A	FMS(%)	50,0 (n=90)	22,2 (n=40)	27,8 (n=50)	0,67(CI95 0,52-0,86)	0,0008
	No-FMS(%)	41,6 (n=324)	17,1 (n=133)	43,3 (n=321)		
Grupo B	FMS F(%)	30,4 (n=38)	21,6 (n=27)	48,0 (n=60)	0,90(CI95 0,74 -1,1)	NS
	No-FMS (%)	32,7 (n=453)	14,1 (n=195)	53,2 (n=736)		
Total	FMS (%)	41,9 (n=128)	21,9 (n=67)	36,1 (n=110)	0,74(CI95 0,63-0,86)	0,00003
	No-FMS (%)	35,9 (n=777)	16,0 (n=328)	48,8 (n=1057)		

035: PACIENTES ONCOLÓGICOS Y TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN EL HOSPITAL DE CRUCES

B. Corcóstegui, R. Mendoza, V. Aparicio, O. Ramón, R. Matorras, T. Martínez-Astorquiza.

Unidad de Reproducción Humana. Servicio de Obstetricia y Ginecología. Hospital de Cruces (Vizcaya).

INTRODUCCIÓN:

En Noviembre de 1978 se instauró en nuestro país el primer banco de semen en un hospital de la red pública

(Hospital de Cruces), pero no fue hasta 12 años más tarde (Julio de 1990), cuando en nuestro centro empezamos a congelar de forma habitual muestras seminales en pacientes con patologías

susceptibles de recibir tratamientos potencialmente esterilizantes.

El propósito de este trabajo, es presentar nuestros resultados, analizar qué

porcentaje de pacientes siguen a lo largo de los años en contacto con el banco de semen, evaluar si se realizan los controles correspondientes y cuántos de ellos han recurrido a una Técnica de Reproducción Asistida.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Desde Julio de 1990 hasta Diciembre del 2008, hemos recibido en el Laboratorio de Andrología de la Unidad de Reproducción Humana del Hospital de Cruces (Vizcaya) 638 pacientes remitidos fundamentalmente de los Servicios de Urología, Oncología Médica y Hematología, tanto de nuestro hospital como del resto de los hospitales del País Vasco, Cantabria, La Rioja y Burgos.

Las enfermedades más frecuentes en los varones que han acudido a nuestro banco de semen para criopreservación espermática han sido: cáncer testicular (42.0%), enfermedad de Hodgkin (30.7%), linfoma no-Hodgkin (10.5%) y leucemia (4.0%). Otras indicaciones fueron el 12.7%. La edad de los pacientes osciló entre los 13 y 58 años,

estando la mayoría de ellos (65.6%), en el rango de 18 a 30 años.

RESULTADOS:

Del seguimiento de estos pacientes llama la atención la alta tasa de casos en que se desconoce su evolución, dado que no se han vuelto a poner en contacto con el banco (65.76%).

Hasta Abril del 2009, tan sólo en 31 de estos 638 pacientes se ha realizado una técnica de Reproducción Asistida. En 27 de ellos ha sido con sus muestras seminales criopreservadas antes de recibir el tratamiento y en los 4 restantes, a pesar de tener muestras congeladas, con semen fresco.

Se han iniciado un total de 47 ciclos FIV/ICSI en 28 pacientes, de los cuáles 3 han sido cancelados por baja respuesta. Se han realizado 38 transferencias embrionarias, consiguiendo 14 embarazos (36,84% embarazo/transfer).

Cuatro de estas pacientes, recibieron el tratamiento tras el fallecimiento de su

pareja y 2 de ellas, quedaron gestantes.

En 5 pacientes, se han realizado Inseminaciones Intrauterinas, obteniéndose embarazo en 3 de ellas.

CONCLUSIONES:

La criopreservación de semen debería considerarse en situaciones en las cuáles se va a aplicar un tratamiento que probablemente afecte a la fertilidad, como en el caso de las enfermedades mencionadas anteriormente.

Tan sólo un pequeño porcentaje de los pacientes que criopreservan semen en estas situaciones (<5%), utilizan posteriormente el mismo con fines reproductivos. Es más, la mayor parte de ellos (65.76%), ni siquiera se ponen en contacto con el banco de semen para realizarse los controles pertinentes tras el tratamiento.

No obstante, entre los pacientes que posteriormente recurren a una TRA, los resultados son alentadores.

036: PERFIL SOCIOLÓGICO DE LAS CANDIDATAS A DONACIÓN DE ÓVULOS

M. García, S. Sánchez, A. Yus, M. Antich, M. Lafont.
Fertilab (Barcelona)

INTRODUCCIÓN:

Dada la demanda creciente de visitas informativas sobre donación de óvulos en las clínicas de reproducción asistida, el objetivo de este estudio prospectivo no randomizado es conocer cuál es el perfil sociológico de las candidatas a ovodonación en nuestro centro.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Durante el año 2008 hasta mayo del 2009, con la colaboración de la unidad de enfermería, se realizó una encuesta escrita con preguntas relativas a diversos aspectos de la vida personal y social de las candidatas. De forma voluntaria, completaron dicha encuesta el día de su visita informativa.

RESULTADOS:

Se obtuvo una participación de 302 candidatas cuya edad media es de 27,1 años, de las cuales, el 45% son europeas (30% españolas, 6% rusas), y el 55% sudamericanas (22% brasileñas, 6% ecuatorianas, 5% colombianas).

Respecto al nivel de estudios, un 37% han cursado el bachillerato, el 27% tienen estudios básicos, un 18% formación profesional, un 9% una diplomatura y un 9% una licenciatura.

El 14% de ellas se dedican a los servicios de limpieza, el 12% a la hostelería y el 6% a los servicios asistenciales. Cabe destacar que sólo un 7% son estudiantes y que un 12% se encuentran en desempleo.

En relación al estado civil, observamos que mayoritariamente son mujeres solteras con pareja (45%), seguidas de las solteras sin pareja (33%), casadas (16%) y separadas (6%).

Referente al número de personas con las que han mantenido relaciones sexuales., el intervalo que predomina es "de una a tres personas" (42%), seguido por "más de cinco" (35%) y "entre tres y cinco" (21%). Señalar que cuatro candidatas afirman no haber mantenido relaciones.

Los métodos anticonceptivos más utilizados son el preservativo (34%) y las pastillas anticonceptivas (30%). Es llamativo que el 12% señalen prescindir de cualquier método.

Casi la mitad de las encuestadas son madres (41%) frente a un 59% que no lo son. Muchas de ellas, el 35%, refieren haber presentado algún aborto.

El 36% han sido donantes en algún momento, en el 47% de las ocasiones de sangre, en el 46% de óvulos en otro centro, y el 6% de ambos.

En cuanto a los hábitos tóxicos, el 71% bebe alcohol ocasionalmente y el 20% afirma haber probado drogas, siendo la marihuana la más consumida (47%).

Finalmente, nos interesamos por la motivación de las candidatas resultando ser en un 37% de los casos la compensación económica, frente al 32% que afirma hacerlo de forma altruista y

el 24% por ambos motivos.

Es interesante el hecho de que el 38% de las encuestadas señalen tener conocidos con problemas de fertilidad.

CONCLUSIONES:

Los resultados de esta encuesta establecen un perfil de mujer de 27 años, española, con un nivel de estudios medio y trabajadora en el sector de servicios. Suelen ser mujeres solteras con pareja estable, sin hijos y que toman precauciones a la hora de mantener relaciones sexuales. En general, no beben alcohol regularmente ni consumen drogas.

Más allá del motivo económico indudable, encontramos casi en la

misma proporción mujeres a las que les mueve el altruismo y un sentimiento de solidaridad, pues suelen tener conocidos con dificultades para tener hijos. Esta disposición altruista es evidenciada en el alto número de mujeres que son donantes de sangre. Hemos observado mayor porcentaje en españolas y, a diferencia de lo que esperábamos, menor en mujeres con hijos o con abortos.

Observamos un gran número de candidatas que han realizado donaciones previas de óvulos lo que pone de manifiesto la necesidad de la creación del Registro Nacional de donantes de gametos.

037: EXPERIENCIA CLÍNICA DE LA VITRIFICACIÓN DE EMBRIONES EN LA UNIDAD DE REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA FE DE VALENCIA.

C. C. Duque, J. V. Martínez, I. Molina, A. Monzó, M. Romeu, A. Romeu.
U. R. H. Hospital Universitario la Fe, Valencia.

INTRODUCCIÓN:

La criopreservación embrionaria permite preservar los embriones excedentes de buena calidad no transferidos en el ciclo en fresco para su posterior transferencia, aumentando las tasas de gestación por ciclo iniciado. La técnica de vitrificación combina tasas de enfriamiento ultrarrápidas y concentraciones elevadas de crioprotectores, de forma que se evita la formación de cristales de hielo durante el proceso, aumentando la supervivencia celular. En este trabajo se presenta la experiencia clínica en vitrificación embrionaria así como los resultados obtenidos tras la desvitrificación y transferencia de embriones criopreservados en la Unidad de Reproducción del Hospital Universitario la Fe de Valencia.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se incluyeron las vitrificaciones

embrionarias realizadas desde Octubre de 2007 hasta Abril de 2009. Durante este periodo se vitrificaron embriones en 234 casos, con un total de 749 embriones vitrificados. Se vitrificó un total de 635 embriones en D+2 (84,8%), 43 embriones en D+3 (5,7%) y 71 embriones en D+5/6 (9,5%) de buena calidad (grados a y b, categorías ASEBIR). En 6 de los casos se vitrificaron embriones en distinto estadio de desarrollo. Para los procesos de vitrificación/desvitrificación se empleó el protocolo descrito por Kuwayama y cols (2005), comercializado por Irvine Scientific (Vit Kit - Freeze/Thaw) con el CryoTip como contenedor. Se realizaron un total de 102 desvitrificaciones, con 253 embriones desvitrificados. 67 parejas realizaron un solo ciclo de criotransferencia, 16 pacientes realizaron dos ciclos de criotransferencia y 1 pareja tuvo tres ciclos de criotransferencia. Se

estudiaron las características morfológicas de los embriones antes y después de la desvitrificación, así como en el momento de la transferencia. Se transfirieron embriones catalogados como viables (>50% blastómeras intactas) tras 3-4 horas de cultivo o los que mostraron al menos una división tras 18 horas de cultivo in vitro. Para la transferencia se utilizaron ciclos sustituidos de preparación endometrial con estradiol transdérmico y progesterona natural por vía vaginal. En caso de que la determinación de hCG (14 días después de la criotransferencia) fuera superior a 20UI/L se citó a la paciente para el diagnóstico ecográfico de gestación (saco embrionario con latido cardíaco).

RESULTADOS:

Se realizaron 102 desvitrificaciones con un total de 253 embriones desvitrificados, 220 embriones en D+2

(86,9%), 21 en D+3 (8,3%) y 12 en D+5/6 (4,7%). La tasa de recuperación embrionaria tras la desvitrificación fue del 92,1% (233/253). La tasa global de supervivencia (>50% blastómeras intactas) fue del 78,5% (183/233), 78% en D+2, 90% en D+3 y 66,6% en D+5/6. Fueron transferidos 174 embriones en 87 criotransferencias, anulándose en 15 casos la transferencia por degeneración/lisis y/o no recuperación embrionaria tras la desvitrificación.

La tasa de gestación bioquímica por

criotransferencia fue del 26,4% (23/87), siendo 27,9% (17/61) en D+2, 21,7% (5/23) en D+3 y 33,3% (1/3) para las transferencias realizadas en D+5/6. La tasa de gestación clínica (saco embrionario con latido cardiaco) fue del 21,8% (19/87), siendo 24,6% (15/61) en D+2, 13% (3/23) en D+3 y 33,3% (1/3) para las transferencias realizadas en D+5/6. La tasa de implantación embrionaria fue del 12,1% (21/174), siendo 13,7% (17/124) en D+2, 6,8% (3/44) en D+3 y 16,6% (1/6) para las transferencias realizadas en D+5/6. La

eficacia global del proceso, calculada como número de gestaciones clínicas sobre el número total de desvitrificaciones fue del 18,6% (19/102).

CONCLUSIONES:

La vitrificación de embriones es una herramienta útil, rápida y segura que permite prevenir la gestación múltiple tras ciclos de estimulación ovárica, además de aumentar la tasa de gestación acumulada por ciclo.

O38: PROGRAMA DE CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES: VITRIFICACIÓN VS CONGELACIÓN LENTA.

P. Duque, L. M. R. Menes, F. Graña, V. Sánchez, A. Gutiérrez, C. Gutiérrez, A. Valles, M. Vázquez, Y. Ruano, N. Fernández, P. Fernández. P. E. de la Fuente, C. García-Ochoa.

CEFIVA (Centro de Fertilización in Vitro de Asturias). Oviedo. Gijón. ANACER (Asociación de Clínicas de Reproducción Asistida)

INTRODUCCIÓN:

La vitrificación es una técnica de criopreservación que consiste básicamente en la utilización de soluciones con altas concentraciones de crioprotectores, que al enfriarse a elevadas velocidades, alcanzan la consistencia de un vidrio. De esta forma, se pasa rápidamente la franja crítica del efecto chilling y se evita la formación de cristales de hielo tanto intracelulares como en el medio extracelular.

La vitrificación se ha convertido en los últimos años en una alternativa a la congelación lenta dados los buenos resultados aportados por diversos grupos y a la sencillez de la técnica.

El objetivo de este trabajo ha sido revisar nuestros resultados del programa de vitrificación/desvitrificación de embriones durante el primer año de implantación de ésta técnica en nuestro centro (2008) y compararlos con los resultados de congelación/descongelación de embriones durante 2007.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se realizaron 36 ciclos de vitrificación/desvitrificación con embriones vitrificados en D+2 ó D+3 de buena calidad durante 2008. Se

utilizaron los medios comerciales de Irvine Scientific cuya composición está basada en DMSO y etilenglicol como crioprotectores permeables y sacarosa como no permeable. Como soporte embrionario se utilizaron las pajuelas de alta seguridad biológica de CryoBioSystem para vitrificación.

Durante 2007, se realizaron 49 ciclos de congelación/descongelación con embriones congelados en D+2 ó D+3 de buena calidad con el protocolo clásico. Se utilizó el medio comercial de Vitrolife (Freeze Kit 1®) con 1,2-propanodiol y sacarosa como crioprotectores. Para el cargado de los embriones se utilizaron las pajuelas para congelación de embriones de CryoBioSystem. La curva de congelación se llevó a cabo con un congelador programable de Minicool.

Tanto la descongelación como la desvitrificación se llevaron a cabo el día anterior a la criotransferencia para

valorar la evolución de los embriones.

RESULTADOS:

CONCLUSIONES: La vitrificación es una excelente alternativa a la congelación lenta, duplicando nuestras tasas de gestación e implantación durante el primer año de funcionamiento con esta técnica, que además es de aplicación sencilla, rápida y económica.

BIBLIOGRAFÍA:

Kuwayama, M., Vajta, G., Ieda, S. and Kato, O. (2005). Vitrification of human embryos using the CryoTip® method. *Reprod. BioMed. Online*, 11:608-14.

Testart, J., Lassalle, B., Belaisch-Allart, J., Hazout, A., Forman, R., Rainhorn, J.D. and Frydman, R. (1986) High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertil. Steril.*, 46(2):268-72.

	Congelación lenta	Vitrificación
Número de ciclos	49	36
Número de embriones descongelados/desvitrificados	146	87
Número de embriones que sobreviven	106	66
Tasa de supervivencia embrionaria	72.60%	75.86%
Número de transferencias	45	31
Número de embriones transferidos	106	66
Número de embriones/transferencia	2.35	2.19
Número de gestaciones	8	12
Tasa de gestación/ciclo	16.32%	33.33%
Tasa de gestación/transferencia	17.77%	38.70%
Número de sacos	11	12
Tasa de implantación	7.54%	18.18%

039: LA SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES CON UN MEDIO QUE CONTIENE ACIDO HIALURÓNICO MEJORA LOS RESULTADOS EN CICLOS DE FIV-ICSI.

Cooper J¹, Busquets A¹, López-Teijón M^{1, 2}, Álvarez JG^{1, 2}.

¹Instituto Marques; ²Fundación Leonardo Marquès, Barcelona.

INTRODUCCIÓN:

La microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) requiere el uso de medios que ralenticen el movimiento de los espermatozoides, facilitando así la angulación de la cola y su posterior inmovilización. La mayoría de estos medios contienen polivinilpirrolidona (PVP), polímero con posibles efectos tóxicos. Otros medios como el SpermCatch™ (Nidacon), que contienen ácido hialurónico (HA), deberían tener una mayor eficacia y seguridad, ya que el HA participa de forma fisiológica en el proceso de fecundación in vivo. El objetivo de este estudio fue el de comparar la eficacia de medios utilizados en la selección espermática que contienen HA vs. PVP en los resultados de ciclos de FIV-ICSI.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se evaluaron un total de 20 ciclos de FIV-ICSI. La mitad de los ovocitos se microinyectaron utilizando un medio que contiene PVP y la otra mitad con un medio que contiene HA (SpermCatch™). Los embriones se clasificaron siguiendo el sistema de scoring embrionario recomendado por ASEBIR. Se transfirieron una media de 2,1 embriones por paciente en D+2 o en D+3 y los embriones sobrantes fueron

congelados. Se compararon las tasas de fecundación, las tasas de división y calidad embrionaria, y las tasas de embarazo obtenidas en ambos grupos. El análisis estadístico se realizó mediante Student t-test y Chi-square.

RESULTADOS:

Las tasas de fecundación por ciclo, las tasas de división y calidad embrionaria fueron más altas en el grupo de SpermCatch™ comparado con el grupo de PVP, si bien estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tablas 1 y 2). Las tasas de embarazo por ciclo fueron similares en ambos grupos (66% y 50 %). Cabe destacar que en el grupo de SpermCatch™ la tasa de

fecundación fue del 100% en un 53% de los ciclos mientras que en el de PVP tan solo en un 12% de los ciclos.

CONCLUSIONES:

Los resultados de este estudio indican que el uso del medio SpermCatch™ mejora los resultados en ciclos de FIV-ICSI comparado con el PVP. La falta de significancia estadística en los parámetros evaluados probablemente esté relacionada con el número limitado de casos evaluados hasta ahora. Estos resultados preliminares deberán ser confirmados en una serie más amplia de casos.

Tabla 1

Parámetros	SpermCatch™	PVP
Nº de ovocitos inseminados	67/80	79/100
Tasa de fecundación por ovocito	83,7%	79,0%
Tasa de fecundación por ciclo	85,8+17,8% (50-100%)	75,0+16,5% (33-100%)
Tasa de división embrionaria	98,5%	96,2%
Total de embriones transferidos	23	19
Embriones congelados	20	27
Tasa de utilización embrionaria	64,2%	58,0%

Tabla 2

Tipo	SpermCatch™		PVP	
	D+2	D+3	D+2	D+3
A	12,0%	7,3%	13,0%	6,1%
B	36,0%	34,1%	25,0%	18,4%
C	21,0%	17,1%	19,0%	22,4%
D	31,0%	41,5%	43,0%	53,1%

040: OPTIMIZACION DEL NUMERO DE OVOCITOS RECUPERADOS EN PUNCIÓN

F. Guijarro, E. Garijo, M. Escudero, A. Guijarro, C. Álvarez

Unidad de Reproducción Asistida, Hospital "La Moraleja" (Sanitas). Madrid.

INTRODUCCIÓN:

Se busca determinar si existe un umbral mínimo y máximo en el número de ovocitos recuperados en punción en los que se optimice el ciclo de Fecundación In Vitro.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se realiza un análisis retrospectivo de los ciclos de estimulación ovárica llevados a cabo en nuestro centro entre marzo de 2007 y marzo de 2009, con un total de 437 ciclos de estimulación ovárica en los

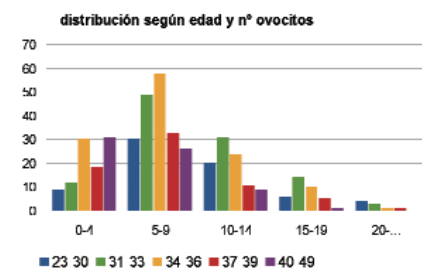
que se ha llegado a realizar punción folicular. Se agrupan las pacientes por franjas de edades (<30, 31-33, 34-36, 37-39 y >40), y para cada grupo se realizan distribuciones según el número de ovocitos obtenidos (<4, 5-9, 10-14, 15-19 y >20). Se emplea la técnica de

ICSI en el 98,6% de los casos con una tasa de fecundación del 80,4%. Se observan también los ciclos en los que ha habido transferencia de más de un embrión y con las transferencias de embriones congelados asociados a cada ciclo.

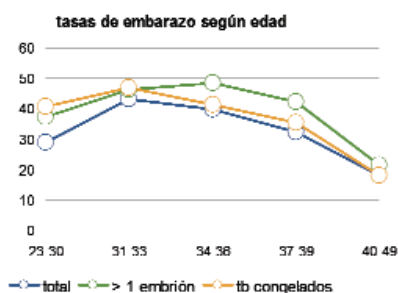
La distribución final por edades y número de ovocitos se refleja en la gráfica de barras:

RESULTADOS:

En todos los grupos de edades se encuentra un aumento significativo en las tasas de embarazo cuando la obtención de ovocitos en punción se



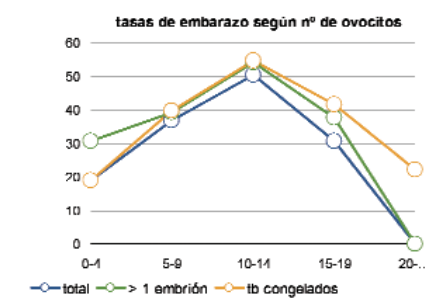
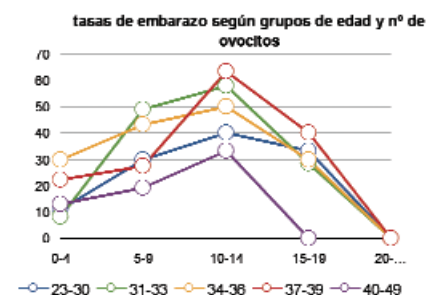
sitúa entre 10 y 14. La baja tasa de embarazos obtenidos en aquellas pacientes menores de 30 años se debe al aumento de hiperestimulaciones y cancelaciones de la transferencia por riesgo de SHO.



CONCLUSIONES:

Las tasas de embarazo mantienen una tendencia ascendente hasta los 10-14 ovocitos recuperados independientemente de la edad de la paciente, maximizándose en este margen los resultados del ciclo de estimulación. De igual forma, se concluye que no son

necesarias estimulaciones ováricas excesivas para mejorar las tasas de gestación.



041: NÚMERO ADECUADO DE OVOCITOS Y EMBRIONES EN UN CICLO DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL PARA ASEGURAR TRANSFERENCIAS ELECTIVAS.

¹P. Duque, ¹L. M. R. Menes, ¹F. Graña, ¹V. Sánchez, ¹A. Gutierrez, ¹C. Gutierrez, ¹A. Valles, ¹M. Vázquez, ²Y. Ruano, ²N. Fernández, ²P. Fernández, ²P. E. de la Fuente, ²C. García-Ochoa.

¹CEFIVA (Centro de Fertilización in Vitro de Asturias). Oviedo. Gijón. ²ANACER (Asociación de Clínicas de Reproducción Asistida)

INTRODUCCIÓN:

El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) es una técnica habitual en los laboratorios de fecundación in vitro que permite seleccionar embriones antes de su transferencia al útero.

OBJETIVO:

El objetivo de este estudio ha sido determinar el número óptimo de ovocitos y embriones que serían necesarios obtener en un ciclo de DGP para llegar a realizar transferencias embrionarias electivas.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se analizaron 94 ciclos de DGP, con diversas indicaciones. La biopsia (1 ó 2 células) se realizó en día +3 del desarrollo embrionario, utilizando una solución ácida de Tyrode para el hatching asistido.

El fijado para hibridación in situ fluorescente (FISH) de las células embrionarias se llevó a cabo mediante protocolo modificado de Tarkowski (lavado de la célula en solución hipotónica KCl 0.075 M y fijación con metanol-acético 3:1). Se estudiaron 9 cromosomas X,Y,13,15,16,17,18,21,22 .

RESULTADOS:

Se realizaron 94 ciclos de ICSI/DGP con punción ovocitaria en todos ellos, obteniéndose 632 ovocitos MII (6,72 Ovocitos MII/punción). Fueron estudiados 454 embriones (4,82 embriones estudiados/punción) de los cuales 387 tuvieron un diagnóstico (4,29 embriones con diagnóstico/punción). De ellos, 140 embriones fueron normales (36,18%), lo que supone una tasa de embriones normales por punción de 1.48.

CONCLUSIONES:

En el global de las indicaciones de DGP y

Indicación	% Embriones con diagnóstico	% Embriones normales /total estudiados	% Embriones normales /total diagnosticados
46XX/47XXX	6/6(100)	4/6(66,67)	4/6(66,67)
47XXY/46XY	13/13(100)	8/13(61,54)	8/13(61,54)
Abortos Repetición	98/112(87,50)	28/112(25)	28/98(28,57)
Feto anómalo previo	6/6(100)	3/6(50)	3/6(50,00)
F. Implantación	51/63(80,95)	17/63(26,98)	17/51(33,33)
FISH alterado	108/117(92,31)	43/117(36,75)	43/108(39,81)
Microdel. Y	10/21(47,62)	9/21(42,86)	9/10(90,00)
S. X frágil	4/4(100)	2/4(50)	2/4(50,00)
Multifactorial	19/22(86,36)	8/22(36,36)	8/19(42,11)
T. recíproca	44/54(81,48)	10/54(18,52)	10/44(22,73)
T. robertsoniana	27/35(77,14)	8/35(22,86)	8/27(29,63)
Edad materna	1/1(100)	0/1(0)	0/1(0,00)
Total	387/454(85,24)	140/454(30,84)	(36,18)

con nuestra tasa de fertilización del 71,83%, hace que necesitemos 6

ovocitos MII por punción, para poder realizar DGP en 3-4 embriones (3.5) y

obtener al menos un embrión normal para transferir. Para lograr que la transferencia sea electiva, necesitaríamos al menos 14 ovocitos MII por punción y lograr estudiar 10 embriones. Estos dígitos van a variar de una forma significativa si tenemos en cuenta cada una de las indicaciones del DGP.

BIBLIOGRAFÍA:

arkowski, A.K. (1966) An air drying method for chromosome preparations from mouse eggs. Cytogenetics, 5:394-400.

042: EFECTO REPARADOR DEL OVOCITO EN CICLOS DE FIV CON VARONES JOVENES Y MAYORES.

M. Esbert, M. Florensa, M. Riqueros, M. Martín, A. Ballesteros, G. Calderón
IVI-Barcelona

INTRODUCCIÓN:

Aunque el efecto de la edad en la fertilidad de la mujer está demostrado, aun no hay consenso sobre el efecto de la edad del varón en cuanto a la capacidad reproductiva. La espermatogénesis es un proceso continuo hasta edades avanzadas, aunque la efectividad en la producción de gametos podría disminuir, produciendo embriones con un pool genético defectuoso. El ovocito tiene capacidad reparadora de daño genético, sin embargo su capacidad también merma con la edad.

Este estudio tiene como objetivo valorar el efecto de la edad del varón en los resultados de un programa de FIV según la edad de la mujer, y también según si provenían de óvulos de una donante sana o de una paciente.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Este estudio incluye 2454 ciclos. Los casos se dividieron en 6 grupos según el origen de los ovocitos (de donante o de paciente) edad de las pacientes (≤ 35 o > 35 años) y de los pacientes (≤ 40 o > 40

años). El número de embriones transferidos por paciente fue el mismo en todos los grupos. El análisis estadístico se realizó mediante Chi-Cuadrado para datos categóricos y ANOVA para los datos continuos. La corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples se usó para el análisis post-hoc.

RESULTADOS:

Los resultados de los ciclos de FIV se detallan en la tabla.

CONCLUSIONES:

Tanto la edad de la mujer como la edad del hombre tienen impacto en el resultado clínico tras la realización de un ciclo de FIV. Los datos obtenidos en este estudio demuestran que los resultados son peores cuando el varón es mayor, y significativamente peores cuando tanto el hombre como la mujer son añosos. Observando los resultados obtenidos en los ciclos de mujeres jóvenes (tanto donantes como pacientes) el ovocito debe tener un papel reparador de daño originado por la edad del varón.

	Donante de ovocitos varón ≤ 40 años (n 729)	Donante de ovocitos varón > 40 años (n 814)	Mujer ≤ 35 años varón ≤ 40 años (n 429)	Mujer ≤ 35 años varón > 40 años (n 39)	Mujer > 35 años varón ≤ 40 años (n 266)	Mujer > 35 años varón > 40 años (n 177)	P
Fecundación mediante IIV (% D.E.)	65.46 21.67	63.17 24.17	57.96 26.17	41.83 44.86	62.66 30.88	58.62 28.26	NS
Fecundación mediante ICSI (% D.E.)	61.05 17.99	61.84 18.13	59.82 23.86	62.74 20.89	57.34 26.01	56.56 27.19	NS
Embarazo clínico por transferencia (%)			55.20 *	61.11 ^{ab}	45.81 ^b	38.67 ^b	< 0.05
Tasa de implantación (%)	48.10 ^a	41.61 ^b	40.19 ^{abc}	42.59 ^{abc}	31.20 ^{cd}	27.11 ^c	< 0.05
Tasa de aborto (%)	13.76	17.15	11.79	18.18	18.27	25.86	NS

^{abc} Valores de las mismas filas con diferentes superíndices son distintos ($p < 0.05$).

043: SELECCIÓN DE EMBRIONES HISTOCOMPATIBLES CON FINES TERAPÉUTICOS

X. Vendrell¹, T. Alberola¹, R. Bautista-Llàcer¹, M. Pardo¹, E. García-Mengual¹, M. Boada², M. Parriego², A. Veiga², M. Pérez-Alonso^{1, 3}.

¹Unidad de Genética Reproductiva. Sistemas Genómicos S.L, Paterna, Valencia. ²USP Institut Universitari Dexeus, Barcelona. ³Departament de Genètica. Facultat de Ciències Biològiques. Universitat de València. València.

INTRODUCCIÓN:

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) conocido en humanos como sistema HLA (Antígenos Linfocitarios Humanos), comprende una región de casi 4 Mb en el brazo corto del cromosoma 6. Contiene los loci más polimórficos del genoma y es el responsable de la respuesta inmune.

Esta respuesta es especialmente importante en los trasplantes alogénicos de células madre hematopoyéticas ya que la disparidad entre el donante y el receptor hace que existan problemas como el rechazo del injerto o la enfermedad injerto contra huésped. Estos problemas aumentan el riesgo de complicaciones y la mortalidad de los receptores de este tipo de trasplantes. La dificultad de encontrar donantes con un HLA idéntico ha generado la demanda social del uso conjunto de las técnicas de reproducción asistida y diagnóstico genético preimplantación (DGP) para seleccionar embriones histocompatibles como futuros donantes de células madre hematopoyéticas del cordón umbilical para el hermano que requiere el trasplante. La complejidad aumenta si la enfermedad implicada es hereditaria y ambos padres son portadores de las mutaciones responsables.

El objetivo del presente trabajo es mostrar la estrategia seguida para los casos de DGP-HLA. Utilizamos como ejemplo el caso de una pareja con un hijo afecto de Anemia de Fanconi. El niño es heterocigoto compuesto para las mutaciones c.4130C>G y c.3788_3790delTCT en el gen FANCA, situado en el cromosoma 16. La aplicación de estas técnicas requiere la autorización expresa previo informe favorable de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida.

MATERIAL Y MÉTODOS:

En estos casos, los estudios preclínicos son de radical importancia. En una primera fase se determina el haplotipo (conjunto de alelos) HLA de los padres y del hijo enfermo. Para ello utilizamos un panel de 55 marcadores moleculares microsatélites (STRs) distribuidos a lo largo de la región HLA mediante PCR-heminested. De estos marcadores, se seleccionan los 8-10 más informativos en la familia y que cubran toda la región HLA. Esto es importante para detectar eventuales sucesos de recombinación simple o doble que pueden ocurrir en los gametos, previos a la formación de los embriones. En estos casos el embrión no sería histocompatible. En segundo lugar adaptamos las técnicas de análisis de fragmentos (c.3788_3790delTCT) y minisequenciación (c.4130C>G) para identificar por métodos directos las mutaciones familiares causantes de la enfermedad. Finalmente, se valida todo el proceso en linfocitos únicos de la pareja. Debido a la gran cantidad de regiones génicas estudiadas de forma simultánea, el DGP se realiza mediante la amplificación previa del genoma completo de cada blastómero con el método de MDA (Multiple Displacement Amplification). Esto nos permite obtener una cantidad de ADN de partida suficiente para estudiar todas las regiones implicadas.

Validado el proceso se inicia el ciclo de estimulación ovárica. La probabilidad de que un embrión sea histocompatible es del 25% y de que sea histocompatible y sano (en caso de existir una enfermedad sanguínea hereditaria recesiva en la familia) es del 18'75%. El control estricto de la estimulación ovárica y el perfecto funcionamiento del laboratorio de embriología son esenciales en estos ciclos. Es necesario obtener un número suficiente de embriones para aumentar

al máximo la probabilidad de tener algún embrión compatible y sano. En este sentido, el consejo genético reproductivo previo es especialmente importante en estas parejas.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES:

En nuestra experiencia el análisis de los haplotipos HLA basado en STRs combinado con diferentes técnicas de detección de mutaciones resulta un método robusto y fiable. Nos permite interrogar de forma simultánea, al menos, 11 regiones génicas distintas, partiendo únicamente de dos copias de ADN procedentes de cada blastómero. Además de la histocompatibilidad, conocemos el estatus genético (sano, portador o afecto) de cada embrión analizado, en los casos que exista una enfermedad sanguínea hereditaria.

044: EL COCULTIVO CON CÉLULAS DEL ENDOMETRIO FAVORECE EL DESARROLLO EMBRIONARIO EN CICLOS DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL POR EDAD MATERNA AVANZADA

A. Mercader, P. Buendía, A. Delgado, B. Gadea, L. Escrich, C. Rubio, C. Simón
 Institut Universitari - IVI Valencia

INTRODUCCIÓN:

Las condiciones de cultivo son determinantes para optimizar el desarrollo embrionario in vitro. Unas condiciones no adecuadas pueden afectar al desarrollo del embrión llegando incluso a provocar el bloqueo de este. En el programa de Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) realizamos la transferencia en el día 5 de desarrollo por lo que necesitamos mantener al embrión en el laboratorio durante varios días. El cultivo prolongado puede realizarse utilizando medios secuenciales o cocultivando los embriones sobre una monocapa celular. Se ha sugerido que el cocultivo favorece el desarrollo embrionario. El objetivo de este estudio fue comparar el desarrollo de los embriones en cultivo secuencial (CS) versus en cocultivo con células del epitelio endometrial humano (CC), en pacientes de edad avanzada (> 38 años) de nuestro programa de DGP.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo que incluye 1.820 ciclos de pacientes de edad materna avanzada, del programa de DGP, desde Enero del 2000 hasta Diciembre del 2008. Las pacientes se dividieron en dos grupos según el tipo de cultivo en el que se habían desarrollado sus embriones: 1.585 ciclos de pacientes (media de edad (SD): 40,5 (1,9) años) cuyos embriones fueron a CC y 235 ciclos de pacientes (media de edad (SD): 40,6 (1,7) años) en los que los embriones estuvieron en CS. Analizamos el desarrollo embrionario de

un total de 6.759 embriones: 5.804 de CC y 955 de CS. Los embriones del grupo de CC fueron cocultivados sobre una monocapa de células del epitelio endometrial humano desde el día 2 hasta el día 5. Durante las primeras 24 horas (día 2), el medio de cultivo fue IVF:CCM (1:1) (Vitrolife AB, Kungsbacka, Sweden). Del día 3 al día 5, los embriones fueron cocultivados sólo con CCM. Los embriones del grupo de CS fueron cultivados en IVF hasta el día 3 de desarrollo. Del día 3 hasta el día 5, día

RESULTADOS:

El porcentaje de embriones en cocultivo que alcanzaron el estadio de blastocisto fue significativamente superior al compararlo con aquellos embriones que habían sido cultivados en cultivo secuencial (51,6% vs. 40,0% (p<0.0001), respectivamente). En la tabla podemos ver los resultados obtenidos cuando comparamos la tasa de blastocisto en función de los resultados del análisis cromosómico.

	CC	CS	p
% Total blastocistos NORMALES	68,0	57,8	p<0,01
% Total blastocistos ANORMALES	44,7	32,8	p<0,0001
% blastocistos haploides	14,8	15,4	NS
% blastocistos triploides	29,3	40,0	NS
% blastocistos con monosomias/monosomíaX	43,2	31,3	p<0,001
% blastocistos con trisomias	55,4	41,3	p<0,01
% Total de blastocistos MOSAICO	51,7	43,2	NS
% blastocistos mosaico aneuploide/2n	59,5	48,1	NS
% blastocistos mosaico aneuploide/aneuploide	46,6	40,2	NS

NS: no significativo

del transfer, los embriones fueron cultivados en CCM. La biopsia embrionaria fue realizada en día 3 de desarrollo. Se realizó el análisis de 7-9 cromosomas (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X e Y) por hibridación in situ fluorescente (FISH) (MultiVyson PB panel y 4CC panel, Vysis Inc. Downers Grove, IL, U.S.A.). Los embriones cromosómicamente normales fueron transferidos y/o congelados/vitrificados. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante el test c2 (p<0.05).

CONCLUSIONES:

- El cocultivo de embriones sobre células del epitelio endometrial humano favorece el desarrollo del embrión hasta el estadio de blastocisto en mujeres de edad avanzada donde la calidad embrionaria suele estar comprometida.
- Este aumento en el porcentaje de embriones que llegan a blastocisto es beneficioso sobre todo en el caso de los embriones cromosómicamente normales ya que nos permite incrementar el número de blastocistos candidatos a transfer.

045: INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE CRIOPRESERVACIÓN DE UN BANCO DE SEMEN EN LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO, LA SUPERVIVENCIA Y LA EFICACIA BIOLÓGICA

A. Mata¹, A. Monqaut¹, A. Garcia¹, O. Lopez¹, O. Martinez- Pasarell¹, R. Bordas², L. Bassas¹

¹Laboratorio de Seminología y Reproducción Fundacio Puigvert. ²Servicio de Ginecología del Hospital de la Santa Creu y Sant Pau de Barcelona.

INTRODUCCIÓN:

Objetivo: Analizar la fragmentación del ADN espermático y los parámetros seminales pre y post congelación y recuperación espermática tras selección- capacitación de los donantes de semen (DS) utilizados en inseminación intrauterina y los resultados de gestación, teniendo en cuenta los efectos del tiempo de congelación y la ubicación de los viales en el contenedor criogénico.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se valoraron muestras de 17 (DS) criopreservadas entre el 2003-2008 y que fueron utilizadas en 77 procesos de inseminación intrauterina. Para el estudio de la fragmentación espermática las alícuotas se descongelaron durante 10min. a 36 °C y se ajustaron a una concentración de 10 millones/mL en PBS. El índice de fragmentación del ADN espermático (IFS) se realizó mediante el método SCD (Halosperm® modificado, Indas) por dos observadores independientes con la lectura de un mínimo de 500 espermatozoides. Se analizó la pérdida relativa de la

motilidad progresiva post descongelación y post selección espermática (centrifugación de gradientes). También se evaluó la tasa de gestación/ciclo. Todos los parámetros se analizaron teniendo en cuenta el tiempo de almacenamiento al descongelar (≥ 3 o < 3 años) y ubicación relativa de almacenamiento dentro del contenedor (1=más superficial, 11=más profundo)

RESULTADOS:

El tiempo de criopresevación fue 978 ± 79 días (media \pm EEM). El IFS fue en los 17 DS estudiados de 14.47 ± 1.28 . Cuando analizamos el IFS según el tiempo de almacenamiento ≥ 3 o < 3 años los resultados fueron similares (13.50 ± 2.63 versus $15.85 \pm 2.66\%$) $p=0.39$. Cuando el tiempo de almacenamiento fue superior a 3 años la motilidad progresiva (a+b) post descongelación fue menor que los almacenados menos de 3 años (34.7 ± 2.6 versus $41.9 \pm 2.4\%$) $p<0.05$. El mismo efecto se observó post selección espermática (36.9 ± 2.9 versus $46.8 \pm 2.9\%$) $p=0.019$. La tasa global de gestación/ciclo fue de 11.16%, los DS almacenados más de 3 años tuvieron una tasa de gestación similar al grupo de DS

con menos de 3 años (13.14 ± 5.31 versus $8.33 \pm 3.57\%$) $p=0.50$. No se observó diferencia significativa del IFS entre el nivel de más superficial a más profundo del contenedor criogénico (15.89 ± 2.33 versus $12.88 \pm 0.64\%$) $p=0.25$ ni tampoco de los parámetros seminales de motilidad progresiva (33.19 ± 3.97 versus $38.33 \pm 4.72\%$) $p=0.40$. Aunque la tasa de gestación/ciclo de las muestras superficiales fue mayor ($15.13 \pm 5.57\%$) que la de las muestras profundas ($6.70 \pm 3.38\%$) la diferencia no fue significativa $p=0.22$.

CONCLUSIONES:

El índice de fragmentación espermático (IFS) y la tasa de gestación/ciclo no se modificaron con el tiempo de criopreservación ni por el nivel de ubicación de las muestras en el contenedor criogénico.

La motilidad progresiva (a+b) post descongelación y post selección espermática empeoró con el tiempo de almacenamiento pero no se vio influida por el nivel de almacenamiento.

046: ANÁLISIS MEDIANTE RT-PCR DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE FSH EN CÉLULAS DE LA GRANULOSA HUMANAS TRATADAS PREVIAMENTE CON TESTOSTERONA Y HCG

D. Agudo, S. Rodríguez, J. A. García-Velasco, M. Martínez, J. Martínez-Salazar, A. Pacheco
IVI Madrid

INTRODUCCIÓN:

El envejecimiento ovárico se traduce en una disminución en la producción de andrógenos, así como en una menor capacidad de respuesta a la

hiperestimulación ovárica controlada. Evidencias recientes sugieren que el pretratamiento con testosterona en gel o parches, con DHEA, o con inhibidores de la aromatasa, que a su vez aumentan la concentración de andrógenos

intrafolículos, pueden mejorar la respuesta a la FSH exógena, amplificando la respuesta a la FSH de las células de la granulosa.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se obtuvieron muestras de líquido folicular procedentes de mujeres sanas sometidas a tratamiento de FIV/ICSI, cuya causa de esterilidad era de origen masculina. Todas ellas firmaron el correspondiente consentimiento informado y leyeron la hoja de información que se les entregó. Tras la identificación de los complejos cumulus-ovocito, los líquidos foliculares se lavaron, en gradientes de ficol, mediante centrifugación a 1500 rpm durante 15 minutos. Las células de la interfase se recogieron y se cultivaron en placas de 24 pocillos en medio M-199, con un 10% de suero bovino fetal durante 3 días.

Estas células fueron tratadas con diferentes concentraciones de testosterona y HCG. Tras la recolección de la monocapa

de células de la granulosa, se extrajo el RNA total, y se estudiaron los niveles de expresión del receptor de membrana de FSH mediante RT-PCR semicuantitativa.

RESULTADOS:

La expresión del receptor de membrana de FSH en células de la granulosa, puede ser regulado in vitro mediante el empleo de diferentes concentraciones de testosterona y HCG. Si comparamos los niveles de expresión de este receptor en los controles frente a los detectados en las células de la granulosa tratadas con testosterona y/o HCG, podemos observar un efecto significativo de la testosterona en los niveles de expresión del receptor de FSH, tanto dosis como tiempo dependiente. En cuanto al tiempo de tratamiento con testosterona, se observó un pico de la expresión del receptor de FSH a las 12-24 horas postratamiento.

Cuando se usó HCG como estímulo, también aumentó la expresión del receptor de membrana de FSH. curiosamente, el efecto de la HCG fue leve a dosis bajas y altas, siendo mayor en dosis intermedias.

CONCLUSIONES:

Tanto la testosterona como la HCG, son capaces de modular la expresión del receptor de membrana de FSH en células de la granulosa humana crecidas in vitro. Este descubrimiento podría apoyar el uso de diferentes estrategias para aumentar la concentración intrafolicular de andrógenos en pacientes con ovarios envejecidos, sometidas a hiperestimulación ovárica controlada.

047: EVALUACIÓN CLÍNICA DE CRIOTRANSFERENCIAS DE EMBRIONES VITRIFICADOS EN DÍA 3 Y DÍA 5.

J. Guerrero, J. Ten, A. Rodríguez-Arnedo, M. A. Carracedo, J. Llácer, R. Bernabeu.
Instituto Bernabeu Alicante

INTRODUCCIÓN:

El desarrollo de un programa de criopreservación embrionaria eficaz es fundamental en los programas de reproducción asistida, ya que permite incrementar las tasas de gestación con la congelación de embriones supernumerarios. La incorporación de la vitrificación como técnica de rutina ha permitido aumentar las tasas de supervivencia, así como las tasas de embarazo. Sin embargo, la cuestión de cual es el estadio de desarrollo óptimo para la congelación embrionaria todavía suscita controversia. El objetivo de este estudio es comparar la capacidad implantatoria de embriones vitrificados en día 3 y día 5.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se analizan retrospectivamente 135 ciclos de criotransferencia realizados en

nuestro Centro durante el año 2008, de los cuales 63 son ciclos de embriones vitrificados en día 3 (grupo I) y 72 en día 5 (grupo II). Se incluyeron tanto ciclos de estimulación ovárica como de donación de ovocitos. Para la vitrificación de embriones se emplearon los medios de Irvine Scientific y el sistema HSV de CryoBioSystem. Los parámetros analizados fueron la tasa de supervivencia embrionaria, tasa de -HCG positiva, y tasas de embarazo e implantación. Los resultados se analizaron mediante el test de t-student y el test chi-cuadrado. Se consideró estadísticamente significativo un P valor <.05.

RESULTADOS:

La tasa de pacientes que tuvieron transferencia en el grupo I fue de 77,8% y en el grupo II 79,2% (no significativo). Los dos grupos no difirieron en términos

de días de estimulación endometrial ($12,89 \pm 0,45$ en grupo I vs. $12,58 \pm 0,36$ en grupo II), grosor endometrial ($9,17 \pm 0,22$ vs. $9,04 \pm 0,21$) y frecuencia de pacientes procedentes de donación de ovocitos (67,3% en grupo I vs. 57,9% en grupo II). Las tasas de supervivencia globales fueron similares en ambos grupos (82,9% en grupo I vs. 74,2% en grupo II) así como el número de embriones transferidos ($2,08 \pm 0,64$ vs. $1,98 \pm 0,44$). El grupo I tuvo un número medio de embriones supervivientes significativamente mayor ($2,37 \pm 0,10$ vs. $2,07 \pm 0,07$), aunque esto no se tradujo en un incremento de la -HCG positiva, que de hecho fue mayor en el grupo de embriones vitrificados en estadio de blastocisto (38,8% vs. 50,9%). La tasa de embarazo clínico (30,6% vs. 36,8%), tasa de implantación (19,6% vs. 23,9%) y tasa de aborto clínico (13,3% vs. 19,0%) fue comparable en ambos grupos.

CONCLUSIONES:

Estos datos muestran que tanto la vitrificación de embriones en día 3 como

en día 5 son alternativas viables que ofrecen unas tasas de éxito razonables. Observamos que existe una tendencia, aunque no significativa, hacía una

mejoría en los resultados clínicos cuando se vitrifican blastocistos, a pesar del mayor número de embriones supervivientes en día 3.

048: DECISIONES REPRODUCTIVAS Y RESULTADOS CLÍNICOS EN PAREJAS CON INFERTILIDAD MASCULINA POR MICRODELECCIONES DEL CROMOSOMA YQ

A. García¹, E. Ars², O. Martínez-Pasarell¹, O. López¹, A. Mata¹, P. Viscasillas³, L. Bassas¹

¹Laboratorio de Seminología y Embriología, ²Laboratorio de Biología Molecular, ³Servicio Ginecología, Fundació Puigvert - Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona

INTRODUCCIÓN:

Objetivo: Las microdeleciones del cromosoma Y son la segunda causa genética más frecuente de infertilidad masculina después del síndrome de Klinefelter. El objetivo de este estudio fue revisar las decisiones de las parejas y los resultados de los tratamientos de reproducción asistida (TRA) en pacientes con microdeleciones Yq estudiados en nuestro Centro.

MATERIAL Y MÉTODOS:

La evaluación andrológica incluyó anamnesis, exploración física, dos o más seminogramas completos, hormonas del eje gonadal (FSH, LH, testosterona), cariotipo y biopsia testicular para diagnóstico y recuperación espermática quirúrgica (REQ). En casos seleccionados se realizaron estudios ultrasonográficos o microbiológicos. Se analizaron las microdeleciones Yq en un total de 423 pacientes infértiles evaluados entre el año 2005 y marzo de 2009, y diagnosticados de oligozoospermia (<5x10⁶/mL) o azoospermia. Se realizó extracción de DNA genómico a partir de sangre periférica de los pacientes, seguida de amplificación mediante dos PCRs multiplex de 8 Sequence Tagged Sites (STSs), 2 de cada una de las regiones AZFa, AZFb, AZFc, y también los genes ZFY/ZFX (control interno) y SRY (Yp). El 4,5% de los pacientes (n=19) presentaron alguna microdelección, que afectó a la región AZFc en 17 casos (89,5%), AZFabc en un hombre con cariotipo diagnóstico de inversión sexual, y AZFbc en otro individuo cuyo

cariotipo mostró cromosoma Y isocéntrico. Los sujetos oligozoospermicos (n=9) tenían entre 0,002 y 1,2 millones de espermatozoides/mL en semen. En un paciente azoospermico se recuperaron aislados espermatozoides en testículo. Todos estos individuos presentaban deleción de AZFc.

RESULTADOS:

Tras completar el proceso diagnóstico 5 pacientes (3 azoospermicos, 2 oligozoospermicos) optaron por no realizar ninguna TRA o abandonaron el seguimiento. Una pareja (oligozoospermia) estaba pendiente de iniciar FIV y otras 2 (azoospermia) en fase de decisión terapéutica. Se realizaron TRA en 11 parejas (10 con delAZFc, 1 con delAZFbc), siendo la edad masculina media de 41,6 años (rango 34-53), y la edad femenina media de 34,6 (rango 27-40).

Tres parejas decidieron diagnóstico genético preimplantacional (DGP) con selección de embriones de sexo femenino y estudio complementario de aneuploidías (5 cromosomas). Se iniciaron 5 ciclos y se biopsiaron un total 22 embriones, resultando 14 no aptos por aneuploidías, 1 no pudo ser diagnosticado, 4 fueron varones normales (portadores obligados), y únicamente se pudieron transferir 3 embriones de sexo femenino en dos parejas, sin conseguirse gestación.

Tres parejas fueron sometidas a FIV/ICSI con espermatozoides propios como

tratamiento inicial, y en otras dos se aplicó dicho tratamiento al no poderse practicar, o fracasar la técnica prevista de DGP. Se realizaron 6 ciclos con espermatozoides procedentes de eyaculado (n=5) o testículo (n=1), con 3 gestaciones (50% por ciclo) y dos partos a término (40% por pareja).

Cinco parejas optaron inicialmente por TRA con semen de donante. Además, otra pareja se sumó a esta opción después de fracasar con DGP. Se realizó un ciclo de FIV-D (sin gestación) y 14 ciclos de IAD, que produjeron 4 gestaciones (28,5% por ciclo, 66,6% por pareja).

En conjunto, la aplicación de las diversas opciones reproductivas consiguió gestación a término o en curso en 6 de las 11 parejas (54,5%) sometidas a tratamiento.

CONCLUSIONES:

En la infertilidad debida a microdeleciones Yq se encontraron espermatozoides en semen o testículo en el 52% de los pacientes (todos ellos con delAZFc), aunque sólo el 31% optaron por intentar TRA con gametos propios en primera instancia. Los resultados clínicos globales son satisfactorios. Sin embargo, la aplicación de técnicas de DGP está limitada por la baja disponibilidad de embriones cromosómicamente normales de sexo femenino, que a menudo se añade a la dificultad de encontrar un número adecuado de espermatozoides.

049: NIVELES DE ACTIVIDAD DE LOS SISTEMAS DE CONTROL ENCEFALINÉRGICO EN LÍQUIDO FOLICULAR DE MUJERES FÉRTILES DE DIFERENTES EDADES.

C. Romeu, A. Urries, M. Lierta, J. Sánchez Rubio, J. A. Duque, B. Sanz*, I. Pérez* y L. Casis*.

Reproducción Asistida Quirón Zaragoza, Grupo Hospitalario Quirón. *Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/EHU.

INTRODUCCIÓN:

El líquido folicular (LF) representa un complejo compartimento funcional en el que se integran distintas señales endocrinas, inmunológicas y mitógenas que hacen que cada folículo ovárico sea único. Las células de la granulosa producen distintas sustancias que pueden ser valoradas en LF estableciendo distintos parámetros de calidad folicular. Algunas de ellas han sido ya descritas. Desde el punto de vista peptídico, existe una familia sintetizada por la granulosa en respuesta a la FSH y secretada hacia el líquido folicular, como son la Inhibina, la Activina y la Folistatina, que han sido las más estudiadas. También han sido ensayados péptidos de la familia de la proopiomelanocortina: encefalinas y endorfinas, cuyo nivel aumenta antes de la ovulación. Aunque la función de éstos últimos aún no está claramente establecida, nuestro equipo investigador ha descrito la importancia que tienen (tanto los péptidos opioides, como sus reguladores y sus receptores) a nivel espermático y ovocitario.

Por ello, y con el fin de comprobar los posibles cambios que pudieran acontecer a lo largo de la vida fértil de la mujer, en la presente comunicación describimos los niveles de actividad de los dos principales enzimas implicados

en la regulación encefalinérgica: la APN (insensible a puromicina) y la PSA (sensible a puromicina).

MATERIAL Y MÉTODOS:

Las muestras de líquido folicular se obtuvieron de donantes voluntarias (que no presentaban patología de fertilidad) en la Clínica Quirón de Zaragoza, utilizándose exclusivamente las muestras no hemolizadas. Tras centrifugación, las actividades se midieron fluorimétricamente utilizando sustratos cromogénicos del tipo de aminoacil-2-naftilamidas (345 nm de excitación, 412 nm de emisión). Los líquidos se clasificaron de acuerdo con la edad de las donantes: 20-24 años (grupo A); 25-29 (grupo B); 30-34 (C); 35-40 (D); > 40 (E). Los resultados obtenidos se presentan como unidades de actividad por ml. Definimos una unidad como la cantidad de enzima que hidroliza un picomol de a.a.-2-naftilamida por minuto.

RESULTADOS:

La regulación de los niveles encefalinérgicos es llevada a cabo fundamentalmente por los dos enzimas ensayados. Posibles modificaciones a lo largo de la edad fértil de mujeres sin patologías asociadas a parámetros de fertilidad nos indicarían la importancia del

metabolismo peptídico a nivel de líquido folicular, lo que podría servir para ensayar tratamientos "in vitro" con potenciadores y/o inhibidores de la actividad, pero, en segundo lugar, y asociándolos a tasas de fertilidad, nos servirían como indicadores fáciles, repetitivos y fiables del estado fértil de la mujer.

Los resultados obtenidos han sido los siguientes (media + SEM):

A) APN: 277,5 + 7,3; PSA: 212,7 + 3,6; B) APN: 238,3 + 5,7; PSA: 217,7 + 11,3; C) APN: 298,4 + 5,2; PSA: 230,4 + 9,1; D) APN: 247,8 + 4,3; PSA: 274,3 + 8,6; E) APN: 282,8 + 3; PSA: 285,9 + 5,2.

CONCLUSIÓN:

No se aprecian modificaciones significativas a lo largo de las diferentes etapas ensayadas, por lo que el metabolismo encefalinérgico en LF parece no verse alterado con la edad. A pesar de ello, son de remarcar los incrementos que se observan en la PSA, por lo que se requieren nuevos ensayos que confirmen o no dicha tendencia.

AGRADECIMIENTOS:

Los autores desean agradecer la inestimable colaboración de MERCK-SERONO.

050: INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN EN LA DINÁMICA DIFERENCIAL DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO EN MUESTRAS DE SEMEN PARA IAC

Y. Cabello, P. Eibes, M. Nogales, M. Sánchez, J. Martín, J. P. Iglesias, R. Domínguez, A. Loroño, M. C. Torres, M. I. García-Nebreda, C. López-Fernández, M. A. Ramírez, A. García-Enguñados, A. Santaolaya. FIV RECOLETOS

INTRODUCCIÓN:

El estudio de la fragmentación del ADN Espermático (FAE) es un parámetro de

interés a la hora de evaluar la capacidad reproductora de un individuo. Los mecanismos que la provocan, cuál es su efecto real sobre la infertilidad de los

individuos, o tan siquiera qué incidencia presenta esta anomalía dentro de un grupo determinado, es información no muy bien conocida en este momento.

El objetivo de este estudio, se centra en analizar la influencia del tiempo que pasa la muestra capacitada en el incubador, y delimitar cuándo ésta alcanza valores críticos que pongan en riesgo la capacidad fecundante de la muestra de acuerdo con los valores establecido por Evenson como críticos en el proceso de fertilización.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Tras el licuado del eyaculado, se separaron 4 alícuotas iguales en fresco en sus correspondientes tubos. Los intervalos de tiempo de cada alícuota para el estudio de la FAE fueron: 0', 30', 2h y 4h, respectivamente, con el fin de estudiar su comportamiento dinámico. Por otro lado, en las muestras capacitadas, se tomaron alícuotas tras swim-up, según el tiempo que éstas pasaron en el incubador a 37°C: 0', 30' y 60' respectivamente. De cada una de éstas, y a medida que fueron pasando los tiempos descritos para estudiar la dinámica de la FAE, se retiraron nuevas alícuotas a intervalos de tiempo: 0', 30', 2h y 4h. Todas las alícuotas tuvieron un volumen final de 25µl, una concentración de 15-18 M spz/ml y se

congelaron a -20°C, hasta su procesamiento conjunto.

La determinación de la fragmentación del ADN, tanto del fresco como del capacitado, fue realizada mediante la técnica Sperm Chromatin Dispersion (SCD) en su versión del kit halosperm® (Halotech DNA SL., España). Las muestras procesadas se tiñeron para ser visualizadas y valoradas mediante microscopía de fluorescencia con elección de campos aleatorios.

RESULTADOS:

El análisis dinámico individualizado de la fragmentación del ADN mostró un incremento en los niveles de fragmentación basal, en la mayoría de los casos (con medias del 3% por hora), a medida que transcurrió el tiempo, con independencia de si la muestra estaba o no capacitada. Los resultados indicaron la no existencia de un patrón, tanto en lo que se refiere a los niveles de fragmentación basales como en los comportamientos dinámicos, que se aplique de forma homogénea, si bien en la mayoría de los casos el proceso de capacitación espermática se ratifica

como una metodología muy recomendable para mejorar los niveles de fragmentación del ADN espermático. Esta situación no es generalizable; de hecho algunos individuos no responden a este comportamiento, alcanzando valores similares a los de la muestra en fresco (que sirve como referencia), por lo que un estudio previo personalizado aporta una abundante información gráfica sobre cómo manipular la muestra en el laboratorio, priorizando unas sobre otras, o bien modificando los parámetros internos del método de capacitación elegido.

CONCLUSIONES:

- 1) La FAE aumenta con los tiempos de manejo e incubación de la muestra por lo que es recomendable minimizarlos en la medida de lo posible.
- 2) Individuos distintos muestran comportamientos dinámicos de la FAE distintos.
- 3) La manera de capacitar una muestra influye en el resultado final de los valores de la FAE.

051: DONACIÓN DE EMBRIONES. NUESTRA EXPERIENCIA

M. Hugas¹, M. Fernández¹, L. Julià¹, B. Aran², A. Veiga², J. Sarquella Ventura¹.

¹Unitat de Reproducció Humana i Diagnòstic Genètic. Clínica Girona. ²Banc de Línies Cel·lulars. Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona. (CMRB)

INTRODUCCIÓN:

La aprobación de la Ley 45/2003 y de su sucesora 14/2006 ha comportado un abanico muy amplio de posibles destinos a los embriones supernumerarios criopreservados procedentes de tratamientos de FIV. Tanto es así, que se permite la utilización de estos embriones para: destinarlos a uso propio, para finalidades reproductivas de otras parejas, para investigación, o bien decantarse para su destrucción.

El presente estudio se centra en aquellas pacientes que, una vez finalizado su proyecto reproductivo, tienen que

decidir el destino de sus embriones supernumerarios. Así se ha analizado si diferentes parámetros influyen en la toma de decisión. Se ha realizado un seguimiento de aquellos embriones que se donaron para investigación. Así como una revisión del programa de donación de embriones criopreservados a otras parejas. Y finalmente una valoración del estado actual del banco de embriones de nuestro centro.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo de 87 pacientes (n = 285 embriones) desde enero del 2004 hasta febrero del 2009. Se informó del

nuevo ámbito legal a todas las parejas al iniciar el tratamiento y en aquellos casos en que el Centro había perdido el contacto con los pacientes con embriones criopreservados, se procedió a informarles por vía telefónica, y si esto no era posible, se procedía al envío de cartas certificadas.

Los embriones destinados a investigación lo fueron para el proyecto: "Derivación de Líneas de Células Madre Embrionarias en condiciones libres de Xenobióticos y caracterización in vivo de su pluripotencialidad" del "Banc de línies Cel·lulars del Centre de Medicina Regenerativa" (CMRB) de Barcelona.

RESULTADOS:

La tendencia ha sido donarlos por investigación, representando un 64.37% frente a un 35.63% que se decantan por la donación hacia otras parejas con finalidades reproductivas. Ninguna pareja ha optado por la descongelación sin ninguna finalidad.

La mediana de embriones criopreservados por paciente en el grupo de donación a otras parejas es de 3.8, y en la donación a investigación de 2.98 ($p \leq 0.05$). Si nos fijamos en la mediana de edad de las pacientes, en el grupo de donación para otras parejas es de 37.13 y en el de investigación 34.89 ($p \leq 0.05$).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros tener o no descendencia y años de criopreservación.

Los embriones donados para investigación ($n=111$), presentaron una tasa de supervivencia del 87.8% y se ha conseguido una línea celular: ES[7].

De los 45 ciclos realizados en el programa de donación de embriones

para otras parejas, con una media de edad de las pacientes receptoras de 40,15 años y con una media de embriones transferidos por ciclo de 2,39, la tasa de embarazo conseguida fue del 42.22% .

Actualmente, en nuestro banco, tenemos un total de 591 embriones, de los cuales 490 son para uso propio, 11 destinados a otras parejas y 56 destinados a investigación. Restan 34 embriones procedentes de 9 pacientes con los cuales el Centro ha perdido el contacto.

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante el test de χ^2 y el paquete estadístico SPSS 11.5 de comparación de medias. Los valores con $p \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

CONCLUSIONES:

Se puede observar que la mayoría de parejas optan preferentemente por la donación de embriones para investigación (Luna et al 2007; Hammarberg et al, 2006). El grupo de pacientes con un número mayor de

embriones criopreservados, tienden a donarlos a otras parejas en lugar de la investigación. Así mismo, las pacientes con más edad también se decantan por esta opción.

Si bien valoramos positivamente el efecto de la nueva Ley 14/2006, ya que permite dar salida a embriones que hasta ahora no la tenían, el efecto no es tan positivo cuando se trata de pacientes acogidas al programa de donación de embriones con finalidades reproductivas.

Un hecho relevante es que ninguna pareja haya pedido la opción de la destrucción. Este hecho se podría atribuir, a una influencia indirecta a la hora de informar (Heng B.C. 2006 ; Fuscaldo et al 2007), o bien a que la cohorte estudiada es muy reducida.

Los buenos resultados en la descongelación y el cultivo de estos embriones donados para investigación, animan a continuar colaborando en próximos proyectos.

Palabras clave: Criopreservación, donación de embriones, investigación.

052: CRITERIOS DE VALORACIÓN EMBRIONARIA EN D+4.

J. González, R. Blanes, R. Vaca, J. Velasco, J.C. Alberto.
Unidad de Reproducción Humana. Hospital Universitario de Canarias (HUC).

INTRODUCCIÓN:

Objetivo: Cuando transferimos embriones en D+4 se obtienen iguales resultados que en D+3 (Pantos et. al, 2008). Al realizar la transferencia en D+4 sabemos que los mejores resultados los obtenemos cuando los embriones están en mórula/compacta (Tao et. al, 2002), pero es interesante poder evaluar los embriones, que en este día todavía están en células.

El objetivo de este trabajo es poder clasificar mejor los embriones en D+4, tanto para su posible transferencia en este estadio como para una mejor selección en un posible cultivo a blastocisto.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se analizaron 88 ciclos con estimulación de la ovulación en pauta larga en los que se realizó la transferencia en D+4. Los embriones se clasificaron en D+3 según criterio ASEBIR y para D+4* con el siguiente sistema:

Categoría A: Mórula/Compacta ó embriones con incremento de más de un 74% de células.

Categoría B: Embriones con incremento en el número de células de 50 al 74%

Categoría C: Embriones con incremento en el número de células de 33 – 49 %

Categoría D: Embriones con incremento en el número de células menor al 33%

*Asignando la categoría más baja de las obtenidas entre D+3/D+4.

Los ciclos se dividieron en 3 grupos según la calidad de los embriones transferidos:

Grupo I: Ciclos con transferencia de embriones de categoría A ó B (24 ciclos).

Grupo II: Ciclos con transferencia de un embrión de categoría A ó B y otro de calidad C ó D (31 ciclos).

Grupo III: Ciclos con transferencia de

embriones de categoría C ó D (33 ciclos).

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 15.0, aplicando el test de ANOVA de un factor utilizando T2 Tamhane.

RESULTADOS:

La media de edad de las pacientes fue de 34,1 ± 3,8, el número de embriones divididos fue de 7,1 ± 3,1 y el número de embriones transferidos de 1,9 ± 0,1.

No se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos en cuanto a la edad, número de embriones fertilizados, embriones divididos ni

embriones transferidos.

Tampoco se encontraron diferencias significativas en la tasa de embarazo entre los grupos I y II (75,0 vs. 48,4, p = 0.124), pero si entre los grupos I vs. III y entre el II vs. III (75,0 vs. 15,2 y 48,4 vs. 15,2, p<0.01 y p<0.05 respectivamente).

Si hay diferencias significativas en la tasa de implantación entre los tres grupos (43,8% vs. 21% vs 6,2%; grupo I vs. II y grupo II vs. III, p< 0.05 y grupo I vs. III, p< 0.01).

CONCLUSIONES:

Con el sistema de clasificación propuesto encontramos diferencias significativas en la tasa de implantación, por lo que podemos aceptar el valor de la clasificación a pesar de no encontrar diferencias significativas en la tasa de embarazo entre los grupos I y II.

Podemos mejorar este sistema de clasificación en D+4 aumentando el número de casos y valorando otros posibles parámetros positivos como la compactación celular en D+4 (según su evolución embrionaria o el número de células en el que se produce la compactación).

053: ENTORNO HORMONAL FOLICULAR EN LOS CICLOS NATURALES Y SU EFECTO SOBRE EL HUSO MEIÓTICO: IMPLICACIONES POTENCIALES DE LA ESTIMULACIÓN SOBRE LA SEGREGACIÓN CROMOSÓMICA.

V. García-Laez, C. Rubio, J. Zulategui, J. M. de los Santos, P. Gámiz, M. Meseguer, M. J. de los Santos. IVI Valencia (Valencia)

INTRODUCCIÓN:

La interferencia farmacológica que se produce durante la estimulación ovárica controlada (EOC) puede estar afectando a la fisiología del ovario ya que los folículos están bajo el efecto de dos circunstancias muy especiales, por un lado la presencia de niveles suprafisiológicos de gonadotropinas en la fase folicular y por otro una prolongación en el tiempo de dichos niveles. Diferentes estudios han publicado la disminución de aneuploidías en embriones procedentes de ciclos con mínima estimulación y los beneficios que una mínima interferencia en la fisiología del ovario podría tener sobre la calidad embrionaria.

OBJETIVO:

Puesto que el huso meiótico es una pieza clave en la correcta segregación cromosómica, el objetivo del presente trabajo es estudiar el efecto que la estimulación ovárica tiene sobre el

estado del huso meiótico de los ovocitos asociados.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio prospectivo de cohortes emparejado de 35 donantes, donde 17 fueron sometidas a un ciclo natural y 18 sometidas a un ciclo de EOC. Tras la punción, el líquido folicular del único folículo preovulatorio de los ciclos naturales y el líquido de uno de los folículos dominantes de los ciclos estimulados fueron aspirados, centrifugados, alicuotados y almacenados a -80 C hasta su utilización. Se midieron las siguientes hormonas: FSH, LH, estradiol, androstendiona, testosterona y progesterona mediante

estudiados se analizaron mediante OosightTM para valorar el estado del huso meiótico (posición y estructura) así como valores de birrefringencia, longitud y anchura. Los análisis estadísticos utilizados fueron pruebas Chi Cuadrado para la comparación de las variables categóricas, t- Student para la comparación de las medias y regresión logística lineal con el 95 % de intervalo de confianza para estudiar la asociación entre el ambiente folicular y los valores de birrefringencia del huso.

RESULTADOS:

Los resultados vienen resumidos en la siguiente tabla:

	Ratio LH/FSH	P4	Androstendiona	Testostercrona	E2
CN	3,8*	6679 ng/ml	105,62 ng/ml*	9,8ng/ml	466280pg/ml*
EOC	0,01	7650 ng/ml	26,39 ng/ml	4,1 ng/ml	224466 pg/ml

*p<0.05

enzimoinmunoanálisis (MEIA). Los ovocitos asociados a los folículos

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de husos

que se consideraron anormales (desestructurados o mal posicionados) entre los ciclos naturales y estimulados siendo del 47.6% en los ciclos naturales y del 52.6% en los ciclos estimulados (IC=0.296-2.058).

Tampoco se observó diferencias en ninguno de los valores de birrefringencia, longitud y anchura

entre los folículos crecidos en situaciones naturales y crecidos bajo EOC.

CONCLUSIONES:

Los folículos de los ciclos naturales modificados mostraron mayores valores de la ratio LH/FSH, androstendiona y de estradiol que los folículos de los ciclos

estimulados, sin embargo esa diferencia no se reflejó en la mejora de los valores de los husos meióticos de los ovocitos asociados, indicando que los cambios observados por efecto de la estimulación en el ambiente folicular tengan una repercusión mínima o inapreciable en las pacientes de buen pronóstico.

054: DIVISIÓN TEMPRANA DE LOS ZIGOTOS COMO FACTOR PRONÓSTICO EN UN PROGRAMA DE DONACIÓN DE OVOCITOS

M. Mollá PhD, L. Muriel PhD, M. Ojeda PhD, S. Portela MD, N. Prados PhD, E. Muñoz MD.
IVI Vigo, Vigo. IVI Sevilla, Sevilla

INTRODUCCIÓN:

La división temprana de los cigotos es considerada como un parámetro no invasivo del potencial de desarrollo embrionario y se ha utilizado en los programas de fecundación in vitro para identificar embriones de mejor calidad. La transferencia de embriones que se dividen de manera temprana se asocia con mayores tasas de gestación e implantación cuando se compara con transferencias de embriones que comienzan la división posteriormente.

El objetivo de este estudio fue valorar la calidad embrionaria dependiendo del patrón de división temprana y su influencia en las tasas de gestación e implantación en un programa de donación de ovocitos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

La división temprana se estudió en 71 ciclos de transferencias embrionarias de parejas incluidas en un programa de donación de ovocitos, desde Julio de 2008 a Marzo de 2009. Los grupos fueron comparables en edad, media de embriones transferidos y factor masculino.

El patrón de división temprana se observó en los embriones 25-26h post ICSI y 26-27h post FIV. Los embriones no divididos se clasificaron según la persistencia o desaparición de los pronúcleos.

Los embriones divididos se clasificaron en tres grupos:

Simétricos: aquéllos con dos células de igual tamaño

Asimétricos: aquellos embriones que tenían dos células de distinto tamaño

Fragmentados: si poseían más de un 20% de fragmentación independientemente de la simetría.

El patrón de división temprana se correlacionó con la calidad embrionaria en día 3, con las tasas de gestación e implantación y se comparó con las de embriones que provenían de cigotos con pronúcleos persistentes o desaparecidos.

La selección de los embriones a transferir se realizó con los criterios de clasificación de día 2 y 3 de ASEBIR sin tener en cuenta la división temprana.

RESULTADOS:

La calidad embrionaria en día 3 fue superior en embriones con división temprana que la de embriones con división tardía (el 56.7% de los embriones fueron aptos para su transferencia o congelación vs. 32.5%; $p < 0.001$). Entre los embriones con división temprana, los simétricos presentaron mejor calidad que los embriones con división asimétrica o los que presentaban fragmentación (60.0%,

52.2% y 24.6% respectivamente; $p < 0.001$).

Por otra parte, los embriones procedentes de cigotos divididos tempranamente tienen un 75% más de posibilidades de dar lugar a un embrión de buena calidad (RR= 1,75; IC: 95% (1.5-2.0); $p < 0.001$).

Sin embargo, aunque existen diferencias en la calidad embrionaria dependiendo del tipo de cigoto del que procedan, las tasas de gestación (TG) e implantación (TI) conseguidas con transferencias de embriones con división temprana simétrica fueron similares a las conseguidas con embriones con división temprana asimétrica e incluso con división tardía (TG: 78.6%, 57.1% y 66.65%; TI: 57.1%, 33.3% y 33.85% respectivamente, $p > 0.05$).

CONCLUSIONES:

La división temprana parece estar asociada con el desarrollo de embriones de calidad embrionaria óptima en día 3. Sin embargo, este parámetro no invasivo de potencial embrionario parece no añadir información adicional en la predicción de las tasas de gestación o implantación. Deberían ser realizados más estudios para confirmar estos resultados.

055: LA IMPORTANCIA DE LA EDAD EN LAS TRANSFERENCIAS SELECTIVAS

S. Camacho, V. Badajoz, M.C. Cañadas, M. De La Casa, A.R. Díaz, J. Gragera, I. Lozano, L. Martínez, C. Urda, J. Gijón, M. Alcaraz, R. Bonache, J. Rodríguez, C. Pérez, A. Martínez de Arenaza.
GINEFIV, Madrid

INTRODUCCIÓN:

Los grandes avances en las técnicas de Reproducción Asistida, tanto a nivel técnico como a nivel profesional, han supuesto un aumento en las tasas de gestación en los últimos años. Pero este incremento lleva asociado un aumento, a su vez, de los embarazos múltiples, poniendo a la sociedad médica y científica en alerta, por sus efectos negativos.

Con el fin de evitar este incremento de gestaciones múltiples, la actual legislación española limitó el número máximo de embriones a transferir a 3 y, a su vez, las clínicas, junto con ASEBIR, intentamos ejercer un auto-control, impulsando la transferencia selectiva de un único embrión.

Por otro lado, el éxito de los tratamientos se ve limitado, entre otras cosas, por la edad materna. Casi todos los estudios coinciden en que la tasa de gestación disminuye con la edad, y muy especialmente a partir de los 37 años. A su vez, las posibilidades que esa gestación no llegue a término aumentan.

En la práctica diaria, nuestros resultados nos guían hacia donde establecer el punto de corte a la hora de recomendar a la paciente la transferencia selectiva de un único embrión, ya que es una buena opción para minimizar la tasa de gestación múltiple pero solo cuando la edad de la paciente lo permita.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo aleatorizado en el cual se analizan 70 pacientes que se realizaron ciclo de FIV, ICSI o técnica Mixta (combinación de las dos anteriores) con ovocitos propios entre los años 2007 y 2008 en nuestro centro. Como único criterio de inclusión se seleccionaron al azar pacientes que se

transfirieron un único embrión procedente de un pool de embriones. Los embriones sobrantes fueron criopreservados.

Se separan las pacientes en 2 grupos por edades: GRUPO A: pacientes menores de 37 años (N=40). GRUPO B: pacientes a partir de 37 años (N=30).

El día de la transferencia, los embriones viables fueron clasificados en 4 categorías en función del número, tamaño y simetría de las blastómeras, así como del porcentaje de fragmentación y posible multinucleación, siguiendo el protocolo de ASEBIR.

Se analizan los resultados obtenidos tanto a nivel de tasa de gestación bioquímica (detección de hormona -hCG en sangre a los 14 días post-transferencia), gestación clínica (detección de latido cardíaco fetal en la 6ª semana de gestación) y tasa de aborto.

RESULTADOS:

	% Gest. Bioquímica	% Gest. Clínica	% Aborto
GRUPO A	47.5 (19/40) *	37.5 (15/40) *	6.7 (1/15) **
GRUPO B	20 (6/30)	16.7 (5/30)	60 (3/5)

	% Gest. Bioquímica	% Gest. Clínica	% Aborto
> 37 años	30,9	25	22,9
> 37 años. TRF 2	34,6	27,4	22
> 37 años. TRF 3	45,9	40	26,5

	% Gestac. Múltiple	Tasa Implantación
> 37 años. TRF 2	27,5	63,8
> 37 años. TRF 3	50	53,8

* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$

CONCLUSIONES:

En el periodo comprendido entre el 1 de enero de 2007 y el 1 de enero de 2009, en nuestro centro, se realizaron 803 transferencias en "fresco" a pacientes mayores de 37 años, de 1, 2 o 3 embriones generados con ovocitos propios.

De esas 803 pacientes, el 25% resultaron gestantes, mientras que si nos fijamos únicamente en las que se transfirieron un único embrión procedente de un pull de embriones, la tasa de gestación fue de un 16,7%. Por el contrario, cuando se transferían 2 o incluso 3 embriones, las tasas de gestación clínica ascendían a un 27,4 y a un 40% respectivamente. Eso si, la tasa de gestación múltiple también aumenta, muy especialmente si se transfieren 3 embriones.

Por todo ello, concluimos que la transferencia selectiva de un único embrión es una buena opción para pacientes jóvenes. Por el contrario, si la paciente es de edad avanzada, nosotros recomendaríamos la transferencia de 2 embriones.

056: RESULTADO ANÓMALO DE FISH EN ESPERMATOZOIDES COMO INDICACIÓN PARA PGS. EXPECTATIVAS.

M. C. Cañadas¹, J. Gijón¹, M. Alcaraz¹, R. Bonache¹, S. Camacho¹, M. de la Casa¹, A. Díaz¹, J. Gragera¹, L. López¹, I. Lozano¹, L. Martínez¹, M. Oter², C. Pérez¹, J. Rodríguez¹, C. Urda¹, E. Velilla², V. Badajoz¹, A. M. de Arenaza¹

¹GINEFIV. Madrid. ²Centro de Medicina Embrionaria. Madrid-Barcelona.

INTRODUCCIÓN:

Desde que podemos estudiar el estado cromosómico de los espermatozoides mediante hibridación "in situ" (FISH) sentimos, pacientes y embriólogos, la necesidad de saber cómo se relaciona dicho resultado de FISH en espermatozoides ("espermFISH") con la calidad cromosómica embrionaria en un análisis preimplantacional (PGS).

Con este estudio trataremos de encontrar, si existe, dicha relación.

Términos clave: FISH en espermatozoides ("espermFISH"), PGS, estado cromosómico.

MATERIAL & MÉTODOS:

Trabajo prospectivo que analiza, mediante FISH, 292 muestras de semen (entre 2006 y 2008) para determinar su estado cromosómico (se analizan los cromosomas 13, 18, 21, X e Y usando las sondas X: Xp11.1-q11.1 CEPX, Y: Yp11.1-q11.1 CEPY DY23, 13: 13q14 LSI 13, 18: 18p11.1-q11.1 CEP18 y 21: 21q22.13-q22.2 LSI 21; se consideran normales valores de disomía inferiores a los controles: Crom. sex.= 0.22%, 13= 0.13%, 18= 0.24%, 21= 0.13%, Diploid.= 0.24%)

Por otro lado se realiza un estudio retrospectivo de 680 embriones, biopsiados entre 2007 y 2008, de los que 652 pudieron ser diagnosticados. Se analiza la indicación y se relacionan mediante análisis descriptivos y de frecuencias (porcentajes, Chi cuadrado: $p < 0.05$ indica diferencias significativas,...). Se consideran normales los embriones euploides/equilibrados/sanos, en cada caso.

RESULTADOS:

De las muestras analizadas sólo el 27.40% resultaron anómalas; aunque clasificando por indicación se observan

diferencias significativas con mayoría de anómalos en casos de "baja tasa/fallo de fecundación" (12,86% norm.-28,20% anóm.; $p=0.002$) o "factor masculino" (11,43% norm.-20,51% anóm.; $p=0.047$). Esto se ratifica observando las tasas de "espermFISH" alterado según la calidad seminal: muestras "malas" presentan aumento de resultados anómalos (36.30%-62,50%, $p=0.00005$), la mayoría son normales en muestras "buenas" (16,03%-6,25%, $p=0.028$) y no hay diferencias significativas en muestras "medias".

alterado. Aunque no hay diferencias significativas (48% norm.-52% anóm., $p=0.586$), sí hay tendencias hacia una mayoría de embriones anómalos cuando el "espermFISH" muestra anomalías en más de un valor y, centrándonos en los cromosomas aneuploides, las diferencias son significativas (27%-73%, $p=0.033$) en autosomas (13, 18 ó 21).

CONCLUSIÓN:

Debido al reducido tamaño muestral de pacientes que tras recibir un diagnóstico

	Normo-A/Mod	A-AN	AT-ATN	OTA-OATN	OA-OAN
Normal	34(16,03%)	31(14,62%)	70(33,01%)	77(36,30%)	0(0%)
Anómalo	5(6,25%)	4(5,00%)	19(23,75%)	50(62,50%)	2(2,50%)
Signific. (p)	0,028	0,024	0,124	0,00005	0,020

Tabla 1.- Resultado del "espermFISH" según calidad seminal.

	Factor masc.	Abortos repet.	Fallo FIV/Mala cal. emb.	Baja tasa/fallo fecundación	Mixta	Factor femenino	Anom. cariotipo	Sin indicación
Normal	24(11,43%)	40(19,05%)	50(23,81%)	27(12,86%)	19(9,05%)	11(5,24%)	3(1,43%)	36(17,14%)
Anómalo	16(20,51%)	7(8,97%)	16(20,51%)	22(28,20%)	7(8,97%)	3(3,85%)	2(2,56%)	5(6,41%)
Signific. (p)	0,047	0,039	0,554	0,002	0,984	0,625	0,512	0,020

Tabla 2.- Resultado del "espermFISH" según indicación.

	Total de casos DPI	DPI por "espermFISH" anómalo
Normal	237(35%)	29(48%)
Anómalo	415(61%)	32(52%)
Signific. (p)	0*	0,586

Tabla 3.- Comparación de resultados del PSG. * El tercer decimal sigue siendo 0.

	Anomal. Sex.	Anomal. Autosóm.	Diploid.	Diplo.+otro
Normal	13(62%)	3(27%)	9(50%)	4(33%)
Anómalo	7(33%)	8(73%)	9(50%)	8(67%)
Signific. (p)	0,064	0,033	1,000	0,102

Tabla 4.- Resultados del PGS según el resultado del "espermFISH".

Al informar a los pacientes del resultado alterado del "espermFISH", se ofrecen 3 opciones: el uso de semen de donante, continuar usando esa muestra sin ninguna otra precaución o realizar PGS, al considerar mayor el riesgo de formar embriones aneuploides.

Analizando las causas de biopsia embrionaria, observamos que menos del 10% (61) se debieron a un "espermFISH"

de "espermFISH" alterado deciden realizar PGS, no se observan diferencias significativas; sin embargo sí se aprecian tendencias claras hacia una mayoría de embriones anómalos en algunos casos de FISH alterado, en las que sólo con un factor de aumento de 2 serían incluso altamente significativas. Hay que seguir acumulando datos que permitan apoyar la información que ayude a los pacientes a tomar una decisión.

057: CAPACIDAD DE IMPLANTACIÓN DE BLASTOCISTOS DESCONGELADOS PROCEDENTES DE EMBRIONES SUBÓPTIMOS.

A. P. de Souza, I. Cabañes, N. Basile, M. Martínez-Burgos, M. Aragonés, L. Herrero, C. Bou. IVI, Madrid

INTRODUCCIÓN:

El cultivo embrionario hasta el estadio de blastocisto es una práctica habitual en los laboratorios de fecundación in vitro, permitiendo no sólo seleccionar embriones con una mayor capacidad de implantación sino también reducir el número de embriones a transferir y a congelar. En nuestro centro, como norma general, la transferencia embrionaria y congelación se realizan en día 3 o en día 5/6 del desarrollo embrionario. Los embriones que, sin ser de mala calidad, no son óptimos para la transferencia ni para la criopreservación en día 3 se dejan en observación en cultivo largo. Los embriones que evolucionan con buena calidad en día 5 o día 6 son criopreservados.

OBJETIVO:

El objetivo de este trabajo es comprobar resultados en términos de tasas de gestación, aborto e implantación de estos blastocistos una vez descongelados.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo que incluye 55 ciclos de transferencia de blastocistos descongelados provenientes de pacientes sometidas a tratamiento de reproducción asistida en el IVI Madrid en el año 2008. Sólo fueron

criopreservados aquellos blastocistos con masa celular interna definida,

RESULTADOS:

Procedimientos	Blastocistos del programa de cultivo prolongado	Embriones de observación
Media de Edad ± SD	34.23	35.56
Media de embriones descongelados	1.69	1.34
Tasa de Cancelación	0%	8%
Media de embriones transferidos	1.54	1.32
Tasa de Gestación Bioquímica	50%	53.65%
Tasa de Gestación Clínica	42.8%	48.78%
Tasa de Implantación	31.8%	47.82%
Tasa de Gemelares	16.6% *	0% *
Tasa de Aborto Clínico	0% *	27.27% *
Tasa de Aborto Bioquímico	14.28%	9.09%

* $p < 0,05$

trofooctodermo con un número adecuado de células y bien organizado.

Comparamos dos grupos: un grupo control con blastocistos congelados pertenecientes a ciclos de FIV del programa de cultivo prolongado con transferencia en día 5/6, y un segundo grupo estudio con blastocistos congelados pertenecientes a ciclos de FIV con transferencia en D3 y que se dejan embriones en observación hasta el estadio de blastocisto.

Utilizamos para ambos grupos la vitrificación con el método Cryotop (Kuwayama et al, 2005).

CONCLUSIONES:

Con los resultados obtenidos, podemos concluir que algunos de los embriones que no son aptos para la transferencia o congelación en día 3 sin que lleguen a ser de mala calidad, consiguen alcanzar el estadio de blastocisto y ser congelados en este estadio logrando así tasas de gestación e implantación comparables estadísticamente con los blastocistos descongelados procedentes de nuestro programa de cultivo largo, si bien presentan una significativa tasa de aborto.

058: COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA DETERMINAR EL VALOR DE REFERENCIA EN UN PROGRAMA DE CONTROL DE CALIDAD EXTERNO DE CLASIFICACIÓN EMBRIONARIA

R. Ruiz de Assin, R. López-Jurado, B. Romero, A. Fernández, B. Rabelo, R. P. Cotarelo, J. A. Castilla, M. A. Calderón. U. Reproducción Hospital Virgen de las Nieves

INTRODUCCIÓN:

La participación en programas de Control de Calidad Externos (CCE) está

recomendado por varias Sociedades Científicas. La evaluación de la calidad embrionaria es de vital importancia a la hora de decidir cuántos y qué embriones

transferir, lo cual está directamente relacionado con la efectividad de un ciclo de FIV y con la probabilidad de embarazo múltiple.

OBJETIVO:

Este estudio pretende determinar cual es el valor de referencia adecuado, para la clasificación embrionaria, en un programa de CCE; la clasificación realizada por la mayoría los laboratorios participantes en el programa de CCE o la clasificación realizada por el consenso de los cinco expertos en clasificación embrionaria.

MATERIAL Y MÉTODOS:

En este estudio se comparan los resultados obtenidos en el programa español de CCE entre 2003 y 2007, con los de un grupo de cinco expertos miembros del grupo de trabajo de calidad embrionaria de ASEBIR. Se compararon un total de 120 videos de embriones (20 cigotos, 50 Día 2 y 50 Día 3) en los que se tenía que decidir entre Buena, Regular o Mala calidad embrionaria. Se consideró que existía acuerdo entre laboratorios cuando más del 75% de los participantes adjudicaba

la misma categoría para un mismo embrión. Se consideró que existía acuerdo entre los expertos cuando los cinco expertos coincidían en la misma categoría para un embrión.

RESULTADOS:

El porcentaje de embriones en los que se obtuvo acuerdo entre los laboratorios participantes fue del 44.2% (53/120), mientras que entre los expertos fue del 98.3% (118/120) ($p < 0.001$).

Cuando se compararon los resultados de la clasificación realizada entre la mayoría de los laboratorios y el acuerdo entre expertos se obtuvo un índice kappa de 0.52 (IC: 0.38-0.65). No existiendo diferencias cuando se realiza la clasificación sobre embriones en Día 2 o en Día 3.

Si sólo tenemos en cuenta el 44.2% de los embriones en los que los laboratorios participantes obtuvieron acuerdo el índice kappa es de 0.63 (IC: 0.44-0.82).

Cuando la clasificación asignada por la mayoría de los laboratorios no coincidía con la asignada por los expertos, en el 56.25% (18/32) de los casos, los laboratorios sobreestimaron la calidad del embrión.

CONCLUSIONES:

1º Existe un menor acuerdo entre laboratorios que entre expertos.

2º El acuerdo entre laboratorios y expertos es moderado aunque sólo tengamos en cuenta los embriones en los que los laboratorios lograron acuerdo.

3º Los laboratorios tienden a sobreestimar la calidad de un embrión.

4º Por todo esto se debería utilizar como valor de referencia de un programa de CCE de clasificación embrionaria, la evaluación realizada por el consenso de un grupo de expertos.

059: CORRELACIÓN ENTRE LA VARIACIÓN DEL ÁREA TOTAL DE LA ZP DE EMBRIONES EN DÍA 2 DE DESARROLLO Y EMBARAZO

L. Mifsud, V. Sáez, I. Rubio, M. Lozano, I. Cuevas, J. Íñiguez
Centros de reproducción FIVIA, S.L. (Torrente, Valencia)

INTRODUCCIÓN:

La zona pelúcida (ZP) es una capa de glucoproteínas que envuelve el ovocito y el embrión protegiéndolo y manteniendo su integridad tridimensional hasta el momento de la implantación. Anomalías en su estructura pueden comprometer la fecundación, la viabilidad del embrión, el proceso de implantación y con ello la posibilidad de conseguir un embarazo. Las características de la ZP están influenciadas por el ambiente hormonal, así como por particularidades propias de cada individuo. La pauta hormonal seguida durante el tratamiento de reproducción asistida (TRA) podría afectar a la misma.

La evaluación de los embriones se basa,

entre otros criterios, en el estudio de distintas características morfológicas, pudiendo ser el de la ZP un criterio más a tener en cuenta. Otros autores han propuesto que el análisis de diferentes variables (como el área, grosor, consistencia, color) de la ZP podrían servir como diagnóstico clínico para la selección embrionaria.

El objetivo del estudio fue observar si existe alguna correlación entre la variación del área total de la ZP de embriones en día 2 de desarrollo (D2) y el embarazo. Además se analizó si factores como la edad de la paciente, la FSH basal, el estradiol y la progesterona el día de la HCG, la dosis de FSH y el tipo de frenado, también tenían alguna influencia sobre el área de la ZP.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se realizó un estudio retrospectivo en pacientes sometidas a un TRA en el Centro de Reproducción Asistida FIVIA (Torrente, Valencia) entre Abril 2008 y Marzo 2009, de los que se analizaron un total de 124 embriones. La media de edad de las pacientes era de $34,53 \pm 4,6$. Se midió el área total de los embriones en D2, utilizando imágenes capturadas digitalmente con el CRONUS3 ("video capture and embryo analysis software"), mediante un microscopio invertido a 20 aumentos y óptica Hoffman.

El análisis estadístico se hizo con el programa estadístico SPSS 11.0 y aplicando el coeficiente de correlación de Spearman ($p = 0.05$) y el de Pearson ($p = 0.01$).

RESULTADOS:

Se vio que había correlación entre el área total de la ZP y el test de embarazo ($p = 0,036$), indicando que aquellos embriones que dieron lugar a embarazo presentaban un área media de $7849,02 \mu\text{m}^2 \pm 3081,99$. En cambio, no se encontró ninguna relación estadísticamente significativa cuando se estudió la influencia de los distintos factores (edad de la paciente, FSH basal,

estradiol el día de la HCG, dosis de FSH, progesterona día HCG, tipo de frenado) en relación con la variabilidad en el área de la ZP.

CONCLUSIONES:

Según los resultados obtenidos con nuestro estudio parece existir un rango respecto al área total de la ZP donde los embriones podrían tener mayores posibilidades de resultar en embarazo.

Por otra parte, según nuestros resultados, ninguno de los factores que hemos estudiado influiría de forma significativa en la relación entre la ZP y el embarazo.

A la vista de este trabajo, sería conveniente realizar un estudio prospectivo randomizado con un tamaño muestral mayor para seguir con la búsqueda de parámetros no invasivos de evaluación embrionaria.

060: COMPARACIÓN ENTRE MEDIOS DE CULTIVO COMERCIALES

J. Herreros, G. Quea, E. Garijo, F. Galera, J. Muñoz
Instituto Madrileño de Fertilidad (IMF). Madrid.

OBJETIVO:

Comparar tres medios de cultivo comerciales con el objetivo de implantar uno de ellos en el laboratorio de FIV en base a sus mejores resultados.

Diseño: Estudio prospectivo randomizado

MATERIAL Y MÉTODOS:

Desde Octubre a Diciembre de 2008 incluimos 125 pacientes de ovocitos propios con edades comprendidas entre 28 y 42 años. Todas las pacientes, con al menos un ovocito, fueron incluidas sin restricciones por factor masculino o femenino. Randomizadamente separamos a las pacientes en los grupos: Vitrolife G5 Plus (Vitrolife, Sweden), Sage (SageMedia) y Global (LifeGlobal). La hiperestimulación ovárica controlada fue iniciada con FSHr-HMG en día 2 ó 3 del ciclo menstrual y la desensibilización hipofisaria se llevó a cabo usando Cetrotide 0.25 mg (Cetrotide, Merck-Serono) cuando el folículo dominante media > 14 mm de diámetro ó

	GLOBAL	SAGE	VITROLIFE
N	40	42	43
Edad (Años)	35.9 ± 3.9	36.4 ± 4.0	36.5 ± 3.8
Ovocitos	7.2 ± 3.1	7.3 ± 3.0	7.1 ± 3.0
Metafase II	5.8 ± 2.9	5.6 ± 3.0	5.7 ± 3.0
Ovocitos fecundados	4.2 ± 2.9	4.0 ± 2.7	4.2 ± 2.9
Nº Embriones A+B	2.8 ± 2.8	2.7 ± 2.8	2.7 ± 2.7
Nº Embriones transferidos	2.2 ± 0.5	2.1 ± 0.5	2.0 ± 0.5
Nº Embriones congelados	1.3 ± 2.1	1.3 ± 2.0	1.2 ± 2.0
Tasa de Embarazo Clínico (%)	57.5%	47.6%	51.2%

en el día 5-6 de estimulación. La ovulación fue inducida con hCG (Ovitrelle, Merck-Serono) cuando la hiperestimulación ovárica dio como resultado al menos dos folículos > 18 mm de diámetro. Después de la extracción de los ovocitos utilizamos la técnica de ICSI y cultivo embrionario hasta el día 3 de desarrollo. En cumplimiento de la ley española, un máximo de 3 embriones fueron transferidos. Dos semanas después observamos el latido cardiaco fetal mediante ecografía por ultrasonidos constatando la gestación clínica. La valoración embrionaria se hizo en base a los criterios de ASEBIR. Los análisis estadísticos fueron realizados con G-Stat 2.0 (GlaxoSmithKline).

RESULTADOS:**CONCLUSIONES:**

No observamos diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros analizados en nuestros grupos de estudio. En base a estos resultados elegimos Global Medium como nuestro medio de cultivo de rutina en el laboratorio de FIV debido a su simplicidad en el set up, además de haber observado un ligero incremento de la tasa de embarazo clínico.

061: ESTIMACIÓN TEÓRICA DEL ERROR DE MUESTREO EN PGD-AS

S. Zamora, A. Clavero, M. C. Gonzalvo, M. Roldán, B. Rabelo, R. P. Cotarelo, L. Martínez, B. Romero.
U. Reproducción Hospital Virgen de las Nieves, Granada

INTRODUCCIÓN:

Si se considera un embrión de 8 células como un lote con 8 ítems, podemos

determinar cual sería el plan de muestreo más adecuado para no aceptar embriones anormales durante el PGD-AS. ¿Es suficiente testar una

blastómera? ¿Cuántas blastómeras se deben de analizar para estar seguro del resultado? En un PGD se pueden cometer dos clases de errores: cuando se clasifica

a un embrión como anormal siendo éste normal (error alpha o falso positivo) o cuando se concluye que un embrión es normal siendo éste anormal (error beta o falso negativo). Nosotros consideramos más importante en un programa de screening tener una baja tasa de falsos negativos (error beta) que de falsos positivos (error alpha). En este estudio se determinará el número necesario de blastómeras a estudiar para encontrar un equilibrio clínicamente útil de estos dos tipos de errores.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se considera un error alpha de 0.10 y un error beta de 0.05. Además, Acceptable Quality Level (AQL), el número de blastómeras anormales con las que un embrión sería siempre aceptado se estima en <1 , lo más próximo a cero. Sin embargo, LTPD (Lot quality assurance sampling), el número de blastómeras anormales que hacen que el embrión sea definitivamente inaceptable, se estima según la bibliografía en ≥ 3 , porque se considera que menos del 30% de

mosaicismo en el embrión es viable. La OC (Operating Characteristics Curves) para los diferentes planes de muestreo se calculó mediante una distribución hipergeométrica. Una, dos o tres blastómeras biopsiadas en las que no se permite que tengan ningún defecto ($c=0$). Un óptimo plan de muestreo será aquel que con una alta probabilidad (90%, $1-\alpha$) acepte (considere normales) embriones con menos de 1 blastómera anormal ($AQL < 1$, próximo a 0), al mismo tiempo que con una baja probabilidad (5%, β) acepte (considere normales) embriones que tengan 3 blastómeras anormales (LTPD³).

RESULTADOS:

Se puede observar como con $n=2$, $c=0$ y $n=3$, $c=0$ se obtiene $AQL < 1$ con valores similares de α (próximos a 0.10). Sin embargo se observan grandes diferencias en el error beta según el plan de muestreo y en todos los casos alejados del ideal 5%. Biopsiando 1 célula y resultando su análisis normal de un embrión de 8 células ($n=1$, $c=0$), se

obtiene una probabilidad del 63% de aceptar embriones con ≥ 3 blastómeras anormales. De cualquier manera, biopsiando 2 ó 3 blastómeras resultando sus análisis normales de un embrión de 8 células ($n=2$, $c=0$ o $n=3$, $c=0$, respectivamente) se tienen un 37% o 18% de posibilidades de aceptar embriones con ≥ 3 blastómeras anormales, respectivamente.

CONCLUSIONES:

Aunque con los 2 últimos planes de muestreo se reduce considerablemente el error beta, se sigue cometiendo un elevado porcentaje de error aceptando como buenos embriones que aquellos que serán no viables. De este modo, con estas estrategias se obtendrá un bajo número de embriones buenos desechados (bajos número de falsos positivos o error alpha), pero un elevado número de embriones anormales aceptados (alto número de falsos negativos o error beta). Esta limitación puede explicar la escasa validez clínica del PGD-AS.

062: EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA EN UNA POBLACIÓN DE JÓVENES ESPAÑOLES DURANTE LOS AÑOS 1999 Y 2009.

A. Yoldi, J. P. Ramírez, A. Vaquero, J. A. Castilla.
Banco de semen CEIFER, Granada

INTRODUCCIÓN:

Es sobradamente conocida la controversia existente en el mundo de la Reproducción en relación con la disminución con los años de la calidad seminal humana. Esta disminución en la calidad seminal presenta seguidores y detractores y, en cualquier caso, existen en la literatura científica estudios a favor y en contra de la misma. En el Banco de semen CEIFER nos sumamos a este debate presentando un estudio retrospectivo de calidad seminal. Hemos analizado la concentración espermática de los varones que se han presentado a nuestro banco de semen con la intención de ser donantes de semen durante los años 1999 a 2009.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Las muestras se han obtenido por masturbación con un período de abstinencia sexual de 3 a 5 días. Han sido analizadas mediante microscopio de contraste de fases y cámara Makler por un observador inscrito desde el año 1999 al Programa de Control de Calidad Externo de Análisis de Semen del Grupo de Interés en Andrología de la ESHRE y de ASEBIR

Se ha estudiado una sola muestra seminal por cada candidato a donante de semen ($n = 1823$). La población objeto de estudio tiene una edad media de 22.02 años (+ 4.01 SD).

RESULTADOS:

Tras la eliminación de los outliers por el método del recorrido intercuartílico, hemos obtenido una concentración media de $78.7 \times 10^6/\text{ml}$ (+ 48.77 SD)

El volumen medio ha sido de 3.7ml (+ 1.5 SD), y la media del total de espermatozoides por eyaculado ha sido de 267.9×10^6 (+ 178.1 SD).

El análisis del intervalo de 11 años que recoge este estudio da como resultado unas rectas de regresión lineal en las que se aprecia una disminución de la concentración seminal a lo largo de los años. Tras aplicar un análisis de correlaciones entre la concentración

espermática y los años del estudio vemos que esta disminución del 0.07% por año es estadísticamente significativa ($p < 0.01$).

Por otro lado, las rectas de regresión evidencian un aumento en el volumen seminal del 0.085% anual con ($p < 0.01$) de significación.

Finalmente, la cantidad total de espermatozoides por eyaculado presenta una recta sin pendiente aparente. Su análisis de correlación muestra una disminución del 0.013% anual sin significación estadística (n.s.).

CONCLUSIONES:

Tras estudiar una población de 1823 aspirantes a donantes de semen, durante los años 1999 a 2009, no apreciamos un descenso en la calidad seminal en cuanto a cantidad total de espermatozoides por eyaculado se refiere.

063: EVALUACIÓN DE LA CALIDAD OVOCITARIA MEDIANTE UN SISTEMA DE LUZ POLARIZADA EN PACIENTES CON BAJA RESERVA OVÁRICA

I. Martínez Arcos, F. Gallego Terris, R. Devesa Hermida, A. Durán Boo, F. López-Roibal, T. García Barral, M. Ortiz Cachón.
USP Hospital Santa Teresa. Equipo Ron

INTRODUCCIÓN:

El éxito de las técnicas de reproducción asistida depende esencialmente de la optimización de los protocolos de estimulación ovárica controlada y de la calidad de los gametos ya que estos dos factores van a determinar el número de embriones con altas tasas de implantación. Por ello, dentro del estudio de la pareja estéril la valoración hormonal y ecográfica del ovario son una parte indispensable y el estudio de la reserva ovárica es realizado sistemáticamente.

Estudios recientes aseguran que los valores elevados de FSH basal (indicador de baja reserva ovárica) reflejan la cantidad de ovocitos pero no su calidad.

El objetivo de este trabajo es determinar la calidad ovocitaria de las pacientes con baja reserva ovárica de una manera objetiva, estudiando los ovocitos obtenidos mediante un sistema de luz polarizada.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se realiza un estudio retrospectivo de nuestra casuística entre noviembre del 2008 y mayo del 2009.

Se determina un grupo control (A) de 12 pacientes cuya reserva ovárica es normal. Se les somete a un tratamiento estándar de estimulación ovárica controlada. Los ovocitos MII

recuperados son analizados mediante el sistema OOSIGHT, obteniéndose valores de la densidad de la zona pelúcida y del huso meiótico así como la desviación de los microtúbulos.

El grupo de pacientes con baja reserva ovárica (B), está formado por 5 pacientes que presentaban un FSH basal $>$ de 8mUI/ml y un recuento basal de folículos antrales de ≤ 3 . En este grupo se realizó una estimulación ovárica acorde a su patología y los ovocitos fueron analizados de igual manera que los del grupo control.

En todos los casos se realizó una I.C.S.I. y para la valoración embrionaria se siguieron los criterios de ASEBIR. El día de la transferencia se seleccionaron los embriones de mejor calidad y frente a misma calidad elegimos el que procede de un ovocito con mejores valores en sus estructuras.

RESULTADOS:

Los datos obtenidos fueron los siguientes:

CONCLUSIONES:

Los datos presentados apoyan la hipótesis de que las mujeres con baja reserva ovárica no presentan una calidad ovocitaria ni embrionaria inferior a la de un grupo de mujeres de similar edad con reserva ovárica normal. Por tanto la tasa de gestación no se ve afectada por la reserva ovárica de la mujer.

	Pacientes	Edad	ovocitos	Z.P	Huso meiótico	Desviación	Embarazos
Grupo A	12	35,7	56	2,07nm	1,63nm	9,56 °	3
Grupo B	5	36	14	2,12nm	1,50nm	9,05 °	2

064: REFLEXIONES SOBRE EL IMPACTO DEL PORCENTAJE DE FRAGMENTACIÓN Y SUS TIPOS SOBRE LA IMPLANTACIÓN DE LOS PREEMBRIONES HUMANOS CULTIVADOS IN VITRO.

M. Borges, A. Galán, C. Albert, A. Tejera, P. Romero, M. Meseguer, M. J. de los Santos
IVI Valencia

INTRODUCCIÓN:

La formación de fragmentos en los preembriones humanos es un fenómeno que ocurre con cierta frecuencia en los embriones cultivados in vitro, su presencia se considera signo de mal pronóstico ya que puede ser indicativo de procesos de apoptosis o puede afectar a los patrones distribución de moléculas de adhesión o las los dominios polarizados de las membranas de las blastómeras. Históricamente la evaluación de la fragmentación embrionaria se basaba en cálculo subjetivo del porcentaje del volumen del preembrión afectado con fragmentos. Sin embargo, otros aspectos como son el tamaño y la distribución de éstos fueron añadiéndose a la evaluación de los preembriones. En el presente trabajo queremos validar este aspecto analizando si el potencial de implantación de los preembriones humanos fragmentados puede estar modificado por el tamaño o la distribución que los fragmentos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo que comprendió un total 2728 embriones transferidos

entre 4 y 5 células en d2 y entre 6 y 10 células en d3 procedentes de 358 de ciclos de ovocitos propios y 348 de ciclos de donación de ovocitos. La relación entre el porcentaje de fragmentación embrionaria en d2 y d3, el tipo de

tipos de fragmentación 2, 3 y 4 para conocer su relevancia en la implantación junto con el porcentaje de la misma, únicamente el tipo \$ tipo 4 mostraron tener una influencia directa como se representa en la siguiente tabla (Tabla 1).

Modelo	Coeficientes estandarizados	t	Sig.	Intervalo de confianza para B al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
1 (Constante)	Beta	26,238	,000	36,831	42,780
	frag divis 3	-5,221	,000	-,935	-,125
2 (Constante)	Beta	25,395	,000	36,189	42,245
	frag divis 3	-0,087	,000	-,857	-,314
	tipo frag d4	-,041	,045	-12,962	-,159

fragmentación (variables de exposición) y la tasa de implantación (variable respuesta) fue analizada mediante un modelo de regresión lineal. Valores de $p < 0.05$ fueron consideradas estadísticamente significativas.

RESULTADOS:

Tanto el porcentaje de fragmentación en d2 como d3 resultó tener una correlación negativa con la tasa de implantación $r=0.19$ $p<0,002$, $Beta=-1.55$, IC 95% (-1,93, -0.42); $r=0.1$ $p<0,0004$, $Beta=-0.101$, IC 95% (-0,93, -0.42) respectivamente. Tras la inclusión en el modelo de regresión lineal de los tres

Tabla1

CONCLUSIONES:

Estos resultados indican que la distribución de los fragmentos no influye sobre la disminución de la viabilidad del embrión debido a la fragmentación, sin embargo, la aparición de fragmentos grandes en los preembriones humanos en d3 tiene un efecto negativo sobre la viabilidad embrionaria que puede ser indicativo de un mecanismo diferente en el preembrión que influya en el compromiso de su viabilidad.

065: EVALUACIÓN DEL ESTADÍO PRONUCLEAR COMO CRITERIO DE SELECCIÓN EMBRIONARIA

I. Cuevas, J. Íñiguez, I. Rubio, L. Mifsud
Hospital General Universitario de Valencia

INTRODUCCIÓN:

Tras realizar una revisión bibliográfica de morfología pronuclear, se planteó en nuestro laboratorio un nuevo sistema de clasificación para los cigotos observados

18-19 horas post – ICSI. Se comenzaron a clasificar básicamente en dos grupos atendiendo a la simetría y yuxtaposición de los pronúcleos. En el tipo A se incluyeron los cigotos cuyos pronúcleos tenían el mismo tamaño y además se

encontraban juntos. Los cigotos con pronúcleos de diferente tamaño o separados fueron clasificados tipo B. Además se contabilizó el número de precursores nucleolares en cada uno de los pronúcleos y se hicieron 3 subgrupos

según su distribución. Los A1 o B1, alineados, los A2 o B2 dispersos por el pronúcleo, y los A3 o B3, uno alineados y el otro dispersos.

Se comenzaron a recopilar estos datos desde Mayo de 2005, aunque al no tener evidencias de la idoneidad de esta clasificación, las transferencias embrionarias se realizaron atendiendo a criterios morfológicos en día 2 o 3 de cultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se analizaron de forma retrospectiva 393 pronúcleos de los embriones transferidos que implantaron (nº sacos gestacionales = nº embriones transferidos) (n = 57) y los que no implantaron (nº sacos = 0) (n 336) entre Junio de 2005 y Diciembre de 2008. Fueron excluidos del estudio los casos

que dieron una gestación bioquímica. La edad media de las pacientes fue de 34.07 \pm 3.72. Los datos fueron analizados con el programa SPSS 11.0.

RESULTADOS:

Las tasas de implantación de los grupos A y B fueron significativamente diferentes. Los embriones del grupo A presentaron una tasa de implantación del 15.7% frente al 4,7% del grupo B con un p-valor del 0.033 (ic. 95%).

Cuando se analizó la disposición (subgrupos 1,2 o 3) y número de precursores nucleolares, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, ni siquiera cuando al menos uno de los 2 pronúcleos presentaba 1 sólo precursor nucleolar.

La probabilidad de implantación de un embrión procedente de un cigoto tipo A con respecto a uno tipo B se calculó siendo la OR 3.82 (p= 0.033).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la edad de la mujer y la de que el cigoto pertenezca al grupo A o B.

CONCLUSIONES:

Ya que según estos resultados los embriones procedentes de cigotos tipo A tienen casi 4 veces más probabilidad de implantar que los tipo B, comenzaremos a incluir este sistema de clasificación de forma prospectiva en la selección embrionaria, esperando de este modo continuar mejorando nuestras tasas de implantación.

066: LA VITRIFICACIÓN PERMITE OBTENER TASAS DE EMBARAZOS COMPARABLES A LAS OBTENIDAS CON EMBRIONES EN FRESCO.

M. Dorado, M. González, M. Hebles, B. Migueles, L. Aguilera, P. Sánchez, F. Sánchez.
Clínicas Ginemed, Sevilla

INTRODUCCIÓN:

La conservación de embriones juega un papel muy importante en la reproducción humana asistida. El proceso de estimulación ovárica se intenta optimizar al máximo, procurando obtener un número suficiente de embriones donde seleccionar los de mejor calidad para transferir y el resto poder congelar para un segundo intento.

El objetivo de este estudio es la comparación de los porcentajes de embarazo por transferencias de embriones procedentes de ciclos en fresco y de vitrificados.

La vitrificación es un método de criopreservación en el que se enfrían las soluciones a altas velocidades para solidificarlas sin formar cristales de hielo, esto minimiza los inconvenientes de la congelación lenta.

MATERIAL Y METODOS:

Se realizó un análisis retrospectivo de las tasas de embarazo de los ciclos en fresco realizados en la clínica desde enero de 2007 hasta septiembre de 2008 con las tasas obtenidas en transferencias de embriones vitrificados. Se incluyeron todos los ciclos en los que hubo embriones para transferir en fresco. En transferencias de vitrificados, incluimos todas aquellas en las que había habido transferencia en fresco y no habían quedado embarazadas.

La vitrificación se realizó con la técnica de Cryotop. Los embriones fueron vitrificados en día +2,+3 ó +5 en función del día que se realizó la transferencia en fresco.

El análisis estadístico se obtuvo aplicando contraste de hipótesis de igualdad de proporción poblacional con un nivel de significación <0.05 con el software comercial SigmaStat 3.1.

RESULTADOS:

Se realizaron 1279 transferencias en fresco consiguiendo una tasa de embarazo del 49,8%. Tras la congelación de los embriones sobrante de estos ciclos, se realizaron 184 ciclos de vitrificados consiguiendo una tasa de embarazo del 41%. Con respecto a las tasas de embarazo en función del número de embriones de buena calidad transferidos no obtenemos diferencias significativas cuando se transfieren al menos 1 embrión de buena calidad en fresco y en vitrificados. Tampoco encontramos diferencias con respecto a la tasa de embarazo en función de la edad de las pacientes ni de la medida del endometrio en fresco y vitrificados.

CONCLUSIONES:

Este estudio compara ciclos en fresco sin seleccionar con embriones que no han sido seleccionados para ser transferidos

en fresco y han sido vitrificados. Por tanto estos embriones considerados “no tan buenos” deberían dar una tasa menor de embarazo si hubieran sido transferidos en fresco y aún más baja al haber sufrido el proceso de vitrificación/ thawing. Sin embargo esto no se observa, lo que nos hace pensar, dado que la funcionalidad

del embrión tras la desvitrificación permanece intacta, que la tasa ligeramente inferior de embarazos en vitrificados se puede deber únicamente a la calidad de esos embriones.

La vitrificación es una técnica que nos permite conservar los embriones

sobrantes de ciclos de reproducción asistida manteniendo intacta la funcionalidad de embriones. Nos permite cancelar ciclos por riesgo de hiperestimulación o por mala calidad endometrial sin comprometer la calidad embrionaria y las tasas de embarazo.

067: COMPARATIVA DE LA TASA ACUMULADA DE EMBARAZO POR CICLO (EN FRESCO + DESCONGELACIÓN) EN FUNCIÓN DEL DÍA DE LA TRANSFERENCIA EN FRESCO (D+2 VS D+3)

J. Cuadros, L. Andrés Criado, M. Sánchez de Burgos, M. Nieto Sánchez, E. Hernández
Clínica FivMadrid

INTRODUCCIÓN:

Actualmente, existe la tendencia a realizar la transferencia embrionaria en d+3, bajo el supuesto de que, si pretendemos seleccionar los embriones con mayor potencial de implantación, el retrasar la transferencia de d+2 a d+3 podría aportar más argumentos para llevar a cabo dicha selección. Sin embargo, algunos autores defienden que la probabilidad de embarazo transfiriendo en d+2 es comparativamente similar a la de d+3. Además, teniendo en cuenta que en d+2 es más probable que haya embriones susceptibles de ser congelados, si se acumularan los embarazos en la descongelación a los embarazos en fresco, la probabilidad de embarazo por ciclo transfiriendo en d+2 y en d+3 se igualaría. Por lo tanto, en este estudio comparamos la tasa de embarazo acumulada de las transferencias en

fresco más los embarazos en descongelación, según si la transferencia en fresco se realiza en d+2 o en d+3.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se analizaron retrospectivamente 456 ciclos de FIV-ICSI realizados en mujeres menores de 39 años. Estos casos fueron seleccionados como de buen pronóstico, dado que en todos ellos se congelaron embriones. 147 transferencias en fresco se llevaron a cabo en d+2 y 309 transferencias en fresco se realizaron en d+3.

RESULTADOS:

En el grupo de transferencias en fresco en d+2, 72 de las 147 transferencias fueron embarazos clínicos (48,9%). Sumando los 21 embarazos clínicos producto de las descongelaciones de los ciclos en los que no hubo embarazo en fresco, la tasa de embarazo acumulada

en el grupo de d+2 fue de 63,3% (93/147). En el grupo de transferencias en fresco en d+3, 156 de las 309 transferencias fueron embarazos clínicos (50,5%). La tasa de embarazo acumulada en d+3 con los 30 embarazos en la descongelación fue de 60,2% (186/309). El análisis estadístico mediante chi-cuadrado no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las tasas de embarazo en fresco ni en la acumulada con la congelación.

CONCLUSIONES:

Los resultados de nuestro estudio muestran que las tasas de embarazo tanto en fresco como la acumulada con la descongelación son similares si se compara la transferencia en d+2 con la transferencia en d+3.

068: ¿ES REALMENTE LA VITRIFICACIÓN MÁS EFECTIVA QUE LA CONGELACIÓN LENTA? PRIMEROS RESULTADOS EN CIRH

M. Rodríguez, L. Prats, O. Cairo, S. Rovira, F. del Río, A. Brassesco
C.I.R.H, Barcelona

INTRODUCCIÓN:

En nuestro centro, empezamos a utilizar la vitrificación de manera rutinaria a

mediados de 2007. Pero no fue hasta finales de 2008 que empezamos a tener demanda de transferencias con embriones vitrificados, de manera que

nos pareció interesante estudiar el rendimiento global de esta nueva técnica. La vitrificación se lleva a cabo con medios Irvine®, siguiendo el

protocolo que marca la casa comercial, utilizando como soporte un sistema cerrado, el Cryotip®. Posteriormente, estos se almacenan en tanques de nitrógeno líquido hasta el momento de su descongelación. Se descongela con medios Irvine®, siguiendo también el protocolo de la casa comercial, dejando los embriones en medio de cultivo hasta el momento de la transferencia, aproximadamente 16 horas después.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se analizaron todos los ciclos de transferencia de embriones criopreservados entre el 1 de octubre de 2008 y el 31 de marzo de 2009, obteniéndose 216 ciclos. Se separaron en función de la técnica de criopreservación utilizada: congelación lenta (196 ciclos) y vitrificación (20 ciclos), tanto si se congelaron en día 2 como en día 3 post-punción. Se excluyeron aquellos ciclos en los que la criopreservación del embrión se realizó en estadio de blastocisto.

Se valoraron los siguientes parámetros: la tasa de supervivencia (embriones que

resisten a la descongelación respecto al total de embriones descongelados), el porcentaje de embriones que evolucionaron del día de la descongelación al día de la transferencia, el rendimiento de la técnica (considerando el nº de embriones transferidos respecto al nº de embriones que se descongelaron); porcentaje de embarazo por transferencia y por ciclo, porcentaje de implantación y por último tasa de aborto.

Todos los valores obtenidos se analizaron mediante el test Chi Cuadrado considerándose como índice de significancia cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS:

Una vez analizados los datos obtuvimos un porcentaje de supervivencia del 67.3% en congelación lenta y un 92.6% en vitrificación ($p=0.0002$). El porcentaje de embriones evolutivos fue del 70.6 % vs. 78% ($p= 0.3496$), el rendimiento de las técnicas fue del 46% vs. 72,2% ($p=0.0004$). El porcentaje de embarazo por transferencia fue del

38.4% vs. 40% ($p=0.9163$) y por ciclo del 31.1% vs.40% ($p=0.5744$). La tasa de implantación fue del 19.6% vs.23.1% ($p=0.7609$) y por último la tasa de aborto fue del 29.5% vs.25% ($p=0.8803$).

Al comparar estos parámetros, sólo encontramos diferencias significativas en las tasas de supervivencia y rendimiento, que fueron mayores en la vitrificación.

CONCLUSIONES:

Aunque el número de casos de embriones vitrificados y posteriormente transferidos hasta el momento sea bajo, los resultados observados nos indican que esta técnica presenta una mayor garantía de supervivencia embrionaria, dando lugar a un menor número de transferencias canceladas, y por tanto, un rendimiento global de descongelación superior. Podemos concluir que con la vitrificación se necesita descongelar un menor número de embriones para obtener la misma tasa de embarazo, implantación y aborto que con la congelación lenta.

069: LA INCIDENCIA DE MULTINUCLEACIÓN EN EMBRIONES CON ÓPTIMO DESARROLLO EMBRIONARIO ES SUPERIOR TRAS FIV-ICSI.

M. C. Pons, I. Solvas, M. Grossmann, R. Noblom, X. Julve, J. Nadal.
Centro Médico Teknon. Unitat Reproducció Assistida, Barcelona

INTRODUCCIÓN:

Ante el incremento de ciclos de FIV-ICSI sin causa masculina evidente y la importancia que tiene la multinucleación en la viabilidad embrionaria, el objetivo del trabajo es investigar la incidencia de multinucleación en función de la técnica de fecundación utilizada y la calidad seminal.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo de 1173 embriones con desarrollo embrionario óptimo (DT: división temprana y estadio de 4- ó 5-

células en día +2) pertenecientes a 515 ciclos de FIV realizados entre 2005 y 2008.

La media de edad de las pacientes en estos ciclos fue de 34,4 años [rango: 20-47]. El promedio de horas post-inseminación en el cual se observa la DT es de 26,3 [rango: 23-29 h] y la observación en día+2 se realiza entre las 43 y las 45 horas post-inseminación. A pesar que las transferencias se realizan en día+3, en este estudio la nucleación se ha valorado en día+2 para garantizar la correcta evaluación de la nucleación en cada uno de los blastómeros.

Del total de embriones estudiados, 323 embriones proceden de FIV convencional (27,5%) mientras que 805 (72,5%) proceden de FIV-ICSI, en 533 debido a calidad seminal baja (CSBaja) mientras que en los 317 embriones restantes la calidad seminal era normal (CSNormal) y las indicaciones son varias (baja respuesta folicular, edad materna avanzada, fallo de inseminación previo...). Se analiza la incidencia de multinucleación en día+2 según la técnica de fecundación y según la calidad seminal. Análisis estadístico: Fisher exact test, $P < 0,001$.

RESULTADOS:

De los 1173 embriones analizados, 152 presentan algún blastómero multinucleado en día+2 (12,9%). En la tabla se muestra que la incidencia de multinucleación en embriones procedentes de FIV-ICSI es significativamente superior (14,9%) que en embriones procedentes de FIV convencional (7,7%). Por otro lado, al analizar la incidencia de multinucleación en los 2 subgrupos de FIV-ICSI no se observan diferencias entre ambos (13,7% en CSBaja y 17% en CSNormal). Sin embargo al comparar la incidencia entre el grupo de FIV convencional y

	Núm embriones	Núm embriones con MNB en día 2	%
	1173	152	12,9
FIV conv	323	25	7,7 ^{a,d}
FIV-ICSI	850	127	14,9 ^{b,c}
FIV-ICSI-CSBaja	533	73	13,7 ^{b,c}
FIV-ICSI-CSNormal	317	54	17 ^{b,d}

a: P=0,0009; b: ns; c: P=0,0078; d: P=0,0004

cada subgrupo de FIV-ICSI sí se encuentran diferencias significativas.

CONCLUSIONES:

En esta población seleccionada de embriones:

1/. El aumento en la incidencia de multinucleación se atribuye a la técnica de ICSI per se.

2/. La incidencia de multinucleación no se ve afectada por la calidad seminal

070: CICLOS POSTERIORES EN PAREJAS CON FALLO TOTAL DE FECUNDACIÓN

J. A. Gragera, M. C. Cañadas, V. Badajoz, S. Camacho, M. de la Casa, A. R. Díaz, I. Lozano, L. Martínez, C. Urda, J. Gijón, M. Alcaraz, R. Bonache, J. Rodríguez, C. Pérez, A. Martínez de Arenaza. GINEFIV, Madrid

INTRODUCCIÓN:

El fallo total de fecundación en ciclos de FIV/ICSI sigue siendo un gran problema en el laboratorio de reproducción asistida. La conjunción de factor masculino severo, escaso número de ovocitos, baja calidad de estos o incluso factores idiopáticos pueden ser la causa. El que se de fallo en un ciclo no implica que vuelva a repetirse en el siguiente pero, para tratar de prevenirlo, es recomendable realizar estudios más específicos del factor masculino. Ya que la fragmentación del ADN espermático o un resultado de FISH alterado puede causar infertilidad en muestras aparentemente buenas. La incorporación de estas técnicas como pruebas de rutina en el laboratorio de FIV ayudan a tomar decisiones, a veces complicadas, como el cambio de gameto.

MATERIAL Y METODOS:

Seguimiento, hasta diciembre de 2008, de los ciclos posteriores a los que sufrieron fallo total de fecundación entre octubre de 2004 y junio de 2007 en la clínica Ginefiv, de Madrid.

RESULTADOS:

De 206 parejas estudiadas, con edad media materna de 35,71 ± 4,44 años, el 38.83% (80) no volvieron a realizar ningún ciclo pero en el seguimiento de los casos se confirmaron 4 gestaciones espontáneas, una de ellas acabada en aborto. De las restantes, 125 realizan al menos un ciclo de FIV-ICSI (1 se canceló por baja respuesta) y otra se hizo un ciclo de IAD. Hasta 24 parejas de las 124 (19,35%) hicieron más de un tipo de

tabla (1): 121 ciclos se realizan con gametos propios y 86 con gametos donados (bien sólo uno bien ambos). En 178 (85.99%) hubo transferencia. En el 17.36% (21) de los "ciclos propios" se observó un nuevo fallo de FIV pero también se dieron 28 embarazos (23,14%), con un 61.71% (17) de evolución a término. De los 86 ciclos restantes, "de donación", se consiguieron 32 embarazos (37,21%), con un 78.13% (25) de evolución a término.

	CICLOS	%	β-HCG	%	A TÉRMINO	%
PROPIOS	121	58,45	28	23,14	17	61,71
≠ GAMETOS	86	41,55	32	37,21	25	78,13
TOTAL	207	100	60	100	42	70

Tabla 1: Comparación entre ciclos homólogos y heterólogos.

ciclo (de gametos propios y de donación). Al analizar el total de ciclos posteriores a fallo de FIV (207) se obtienen los valores expresados en la

Atendiendo al gameto donado dividimos los 86 ciclos y comparamos tasas de embarazo y evolución a término (tabla 2).

	CICLOS	%	β-HCG	%	A TÉRMINO	%
OVOCITO	56	65,12	22	39,29	16	72,73
SEMEN	11	12,79	4	36,36	3	75
AMBOS	19	22,09	6	31,58	6	100
TOTAL	86	100	32	100	25	78

Tabla 2: Comparación entre ciclos con gametos donados

CONCLUSIONES:

Aunque hay diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de embarazo (p: 0,028), no se da en la tasa de evolución (p: 0,14) si comparamos ciclos posteriores con gametos propios o donados en parejas con fallo de fecundación. Cuando se produce dicho fallo puede recomendarse un nuevo ciclo

con gametos propios (hasta el 82.64% consigue embriones) si no se objetiva un resultado de FISH o de fragmentación de ADN espermático alterado. Hay que intentar agotar todas las posibilidades para conseguir un hijo biológico, pero con dos fallos de fecundación lo más recomendable es cambiar de gameto, aunque es necesario ayudar a la pareja en esta difícil toma de decisión.

BIBLIOGRAFIA:

1.- Habilidades de comunicación en reproducción asistida. Grupo de interés de Psicología de la Reproducción. Sociedad Española de Fertilidad. Coord: Agustín Moreno Sánchez. Edikamed, SL. 2008. Madrid.

071: SUPER-ICSI: NUEVO TRATAMIENTO EN FACTOR MASCULINO

B. Migueles, M. Dorado, M. Hebles, M. González, L. Aguilera, P. Sánchez, F. Sánchez.
Clínica Ginemed, Sevilla

INTRODUCCIÓN:

Las nuevas técnicas de diagnóstico del espermatozoide como la determinación de la fragmentación del DNA o la observación del mismo con técnicas de microscopía electrónica, nos dan una información valiosa sobre patologías espermáticas que el seminograma de rutina es incapaz de detectar. Hasta hace bien poco, los datos que nos ofrecían las técnicas de determinación de la fragmentación del DNA tenía escasa validez a la hora de su aplicación en la rutina del laboratorio.

La aparición de microscopios de última generación que nos dan la posibilidad de observar el espermatozoide con mayor detalle, nos dan la oportunidad de relacionar esta fragmentación del DNA para la que, aunque conocíamos su existencia, no sabíamos como tratar hasta ahora. Diferentes grupos han relacionado en sus trabajos la existencia de vacuolas en el núcleo de espermatozoides con fragmentación del DNA. Un semen diagnosticado como "NORMAL" por un seminograma rutinario puede presentar una fragmentación alterada que nos va a dar lugar a embriones que si bien no ven alterada su tasa de fecundación ni en la calidad embrionaria, si van a presentar diferencias como una menor tasa de implantación y de división a partir de día +3 y una mayor tasa de aborto.

proveniente de otro.

A todas ellas se les realizó el test de fragmentación medido por SCD con el kit Halosperm® y en los tres casos superaba el 25%, sólo una de ellas presentaba un semen con OTA severa, en los otros dos casos el recuento y la motilidad eran "aceptables" según el seminograma rutinario.

RESULTADOS:

Los embriones transferidos en el ciclo en el que obtuvimos embarazo no eran de mejor calidad que los transferidos en ciclos anteriores (salvo en el caso A, del que no tenemos datos anteriores ya que provenían de otro centro). En las tres parejas obtuvimos embarazo tras la selección de espermatozoides con morfología normal y libres de vacuolas.

CONCLUSIONES:

El hecho de que una fragmentación del DNA espermático nos dé igual tasa de

morfología libres de vacuolas, van a dar lugar a embriones con una mayor tasa de implantación.

BIBLIOGRAFÍA:

1. The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. Arie Berkovitz, Fina Eltes, Sholomit Yaari, Nathan Katz, Ilya Barr, Ami Fishman, Benjamin Bartoov. Human Reproduction. Vol 20 Nº1, pp185-190, 2005

2. Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome?. Arie Berkovitz, Fina Eltes, Adrian Ellenbogen, Sigal Peer, Dov Feldberg, Benjamin Bartov. Human Reproduction Advance Access published February 23, 2006

3. Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. Pierre Vanderzwalmen, Antje

	PACIENTE A	PACIENTE B	PACIENTE C
Seminograma	Oligo-asteno leve Terato severa	Terato moderada	OTA severa
Test de fragmentación	47%	27%	31%
Fallos previos	3 fallos previos en ICSI	1 ciclo propio en ICSI 2 en Donación de óvulos	2 fallos previos en ICSI
Transfer en fallos previos	No existen datos	4cg2 (dia+2) 4cg3 (dia+2) 6cg1 (dia+3) 4cg3 8cg1 5cg3 5cg1	5cg2 8cg2 8cg3 8cg1 (dia+3) 6cg2 8cg3
Calidad embrionaria traas SUPER-ICSI	8cg2 8cg1-2 transfér cn +3 8cg2-3	4cg1 4cg1 transfér cn +2 4cg1	6cg2 7cg2 transfér cn +3 6cg3

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se seleccionaron tres parejas con tratamientos previos en reproducción asistida ya fuese en nuestro centro ó

fecundación, división y fragmentación embrionaria, nos puede llevar a error en la determinación al tratamiento a aplicar en fallos de implantación previos. La selección de espermatozoides de buena

Hierner, Paul Rubner, Magnus Bach, Anton Neyer, Astrid Stecher, Petr Uher, Martin Zintz, Bernard Lejeune, Sabine Vanderzwalmen, Guy Cassuto, Nicolas H Zech. RBMOnline- Vol 17, Nº 5. 2008, 617-62

072: EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE EGF (ERBB4) EN OOCITOS Y EMBRIONES DE RATÓN.

M. J. Perianes, E. M. Miguel-Lasobras, E. Pozo-Guisado, F. J. Martín-Romero, I. Santiago Álvarez.
Dpto. Anatomía, Biología Celular y Zoología. UEX, Badajoz

INTRODUCCIÓN:

La implantación es sin duda uno de los procesos más trascendentes en el desarrollo, y en consecuencia, uno de los periodos más estudiados en el ámbito de la reproducción. La activación de ErbB4 define la capacidad implantatoria del embrión y es por tanto un factor determinante en la sincronización del útero con el embrión. Aunque la capacidad de ErbB4 para unirse a su ligando EGF está sujeta al periodo competente para la implantación del embrión, su expresión se remonta a los primeros estadios de desarrollo preimplantacional, habiéndose podido comprobar la presencia de dichos receptores desde el segundo día de desarrollo (2 células). No hay evidencias sin embargo de la manifestación de ErbB4 antes de la primera división o en el proceso de fecundación.

El propósito de este estudio es determinar el patrón de expresión de ErbB4 desde la fase de vesícula germinal hasta el momento de la implantación embrionaria. Así mismo, y mediante la utilización de técnicas de reproducción

asistida, se pretende comprobar si existen o no diferencias en la expresión de dichos receptores entre embriones obtenidos por fecundación "in vitro" o bien obtenidos directamente del útero.

MATERIAL Y MÉTODOS:

La expresión de ErbB4 ha sido determinada por inmunofluorescencia a partir de oocitos y embriones de ratón de la cepa B6D2-F1 en diferentes estadios de maduración y desarrollo. Las hormonas utilizadas para estimular la producción de oocitos han sido: Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) y Gonadotropina Coriónica Humana (hCG). La obtención de vesículas germinales se procuró por ovariectomía, 46h después de la estimulación con eCG y los oocitos en fase Metafase I a partir de la maduración in vitro de dichas vesículas germinales 11h post incubación. Por otra parte, los oocitos en metafase II fueron obtenidos a partir del ámpula del oviducto 14h tras la estimulación de la ovulación con hCG. Los embriones desde el estadio de pronúcleos hasta el estadio de blastocisto se obtuvieron por fecundación "in vitro".

RESULTADOS:

En este trabajo se presentan por primera vez, evidencias de la expresión de ErbB4 en diferentes estadios de desarrollo del oocito así como una serie completa de la expresión de dicho receptor a partir de embriones obtenidos por fecundación "in vitro" y hasta el estadio de blastocisto.

CONCLUSIONES:

Nuestros resultados confirman que la expresión de ErbB4 es evidente en el oocito incluso antes de la fecundación. El significado de la presencia de este receptor en etapas previas a la fecundación esta por determinar, aunque podría suponer un indicador del futuro potencial implantatorio embrionario. Por otra parte, no parece haber diferencias en la presencia de estos receptores entre embriones obtenidos in vivo y los producidos por fecundación "in vitro".

073: INFLUENCIA DE LA CENTRIFUGACIÓN DEL SEMEN EN LOS RESULTADOS DE LOS CICLOS DE ICSI

R. Garnica, M. Lara, C. Alonso, B. Buch, C. Segura, M. Martínez-Moya.
Unidad de Reproducción Centro Gutenberg. Málaga

INTRODUCCIÓN:

Desde que se vienen aplicando las técnicas de capacitación seminal en TRA, los efectos de las mismas han sido un tema discutido por numerosos autores. Las más empleadas son los gradientes de densidad y el Swim-Up. Un paso común en ambas técnicas es la centrifugación, en el Swim-Up además se concentran todos los componentes del eyaculado.

Aunque en la bibliografía no hay consenso sobre los efectos adversos de la centrifugación y concentración en el Swim Up, algunos autores indican que aumenta el estrés oxidativo provocando un incremento de los ROS que afecta a la integridad de la membrana, a la movilidad y a la estructura del DNA del núcleo espermático.

Para comprobar los efectos indirectos

del Swim-Up se ha realizado un estudio de los resultados obtenidos en los ciclos de ICSI de la Unidad de Reproducción de Centro Gutenberg (2006-2009), empleando como técnicas de capacitación seminal, el Swim-Up convencional (con centrifugación) y Swim-Up directo (sin centrifugación).

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo de 846 ciclos de ICSI realizados durante los años 2006-2009 en mujeres menores de 38 años y sin factor masculino severo asociado (se considera factor masculino severo cuando la concentración de espermatozoides en el eyaculado es < 1x10⁶ esp/cc y/o los espermatozoides con movilidad A+B < 100.000 esp/cc.).

El total de ciclos realizados se ha dividido en dos grupos en función de la técnica empleada para la capacitación del semen. Grupo A: Swim-Up estándar (semen centrifugado) y Grupo B: Swim-Up directo (sin centrifugar). Dentro de cada grupo se ha diferenciado entre normozoospermias y factor masculino no severo.

Se han comparado las tasas de fecundación, implantación, embarazo y aborto en ambos grupos; empleándose el test de Chi cuadrado para el estudio estadístico de los datos obtenidos.

RESULTADOS:

Los resultados muestran una tasa de fecundación y de embarazo superior en el grupo B (70.4% y 64.6%) respecto a

los del grupo A (67% y 50.4%). La tasa de aborto del grupo B es inferior a la de grupo A (9.52 % versus 19.52%). Sin embargo no hay diferencias estadísticamente significativas en la tasa de implantación entre ambos grupos (B: 36.8% versus A: 31.6%).

Cuando se comparan sólo normozoospermias o sólo factor masculino en ambos grupos los resultados son similares, aunque no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en las tasas de aborto.

	NORMOZ. CENTRIE.	NORMOZ. NO CENTRIE.	FACTOR MASC. CENTRIE.	FACTOR MASC. NO CENTRIE.
TASA IMPLANT	25,40%*	36%*	32,9%*	37%*
TASA EMB./ TRANSF	45,40%*	70,50%*	51,4%*	62,5%*
TASA ABORTO	22%	8,33%	19,09%	10%

* Existen diferencias estadísticamente significativas

CONCLUSIONES:

Según los resultados que se presentan y teniendo en cuenta las posibles influencias de otros factores no estudiados, se pueden observar mejores resultados en los ciclos de ICSI en los que no se centrifuga la muestra de

semen para su capacitación.

Varios autores han estudiado los efectos que la centrifugación y concentración pueden tener sobre los espermatozoides. Entre los efectos adversos estudiados aparece un aumento de ROS como consecuencia del estrés oxidativo que provoca daños en el espermatozoide, pudiendo alterar la integridad del DNA. Aunque en este trabajo no se ha profundizado en el estudio de los espermatozoides y no se presentan datos sobre esos factores, se ha utilizado como

referencia indirecta los resultados de los ciclos de ICSI, puesto que una alteración en el espermatozoide puede dar lugar a un bajo rendimiento del ciclo.

A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que cuando la calidad de la muestra lo permita, es aconsejable hacer Swim Up directo frente a Swim Up convencional.

074: IMPORTANCIA DEL ANALISIS DE ESPERMATOZOIDES MEDIANTE FISH EN EL SCREENING DE DONANTES: RESULTADOS PRELIMINARES

A. Colomar^{1, 3}, S. Fernández^{1, 3}, E. Toro^{1, 3}, M. Elbaile^{1, 4}, M. López-Tejón^{1, 2}, E. Velilla^{1, 3}

¹Institut Marquès, Barcelona; ²Fundación Leonardo Marquès, Barcelona; ³Centro de Medicina Embrionaria, Barcelona, Madrid; ⁴Biosperm, Sabadell

INTRODUCCIÓN:

Durante los últimos 20 años se ha observado una disminución de la fertilidad en países industrializados debido, al menos en parte, a una disminución de la calidad seminal. Aunque las anomalías cromosómicas de los espermatozoides se relacionan principalmente con una disminución en el recuento de espermatozoides (oligozoospermia), algunas parejas con muestras normozoospermicas presentan bajos resultados en técnicas de reproducción asistida debido a la presencia de aneuploidías en los espermatozoides. Estos dos factores

combinados sugieren que la elección de donantes de semen basada únicamente en los criterios estándar es insuficiente. El principal objetivo de este estudio fue evaluar la importancia del análisis de espermatozoides mediante FISH en el screening de donantes de semen.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se incluyeron un total de 22 candidatos a donantes en el Banco de Semen Biosperm SL (Instituto Marquès SLP, Barcelona) que cumplían con todos los requisitos legales y de parámetros de calidad seminal. Las muestras de semen

se fijaron para realizar la técnica de FISH. Para su análisis se utilizaron sondas locus específicas (LSI) para los cromosomas 13 y 21 y sondas centroméricas (CEP) para los cromosomas 18, X e Y. La serie control utilizada consta de 5 varones fértiles normozoospermicos con un cariotipo normal. Un total de 101.855 núcleos de espermatozoides fueron evaluados. El análisis estadístico utilizado fue el test Chi -Cuadrado. Las diferencias en las aneuploidías espermáticas entre el grupo control y el grupo de donantes se consideraron significativas cuando el valor de p < 0.05.

RESULTADOS:

El 4,5% de los donantes que cumplían con todos los requisitos presentaron aneuploidías en espermatozoides eyaculados (1 de 22 donantes testados). Se observó un aumento estadísticamente significativo de espermatozoides diploides en la muestra de este donante ($p < 0,05$).

CONCLUSIONES:

Los donantes de semen aceptados en un banco de semen proporcionan un elevado número de muestras de semen durante su período de donación. Los resultados de este estudio indican que un 4,5% de los donantes pudieran presentar aneuploidías en los espermatozoides que posteriormente serán utilizados en tratamientos de

reproducción asistida, pudiendo comprometer los resultados obtenidos. Por consiguiente, el estudio de aneuploidías en los bancos de semen mediante FISH debería incluirse en la selección de donantes para optimizar los resultados en técnicas de reproducción asistida. Para confirmar estos resultados preliminares es necesario ampliar el número de casos.

075: LA TASA DE ANEUPLOIDIAS EN ESPERMATOZOIDEOS NO AUMENTA CON LA EDAD PATERNA

A. Colomar³, S. Corral¹, M. Oter¹, S. Fernández³, E. Toro³, C. Cañadas², V. Badajoz², V. Verdú², M. López-Teijón³, E. Velilla¹
¹Centro de Medicina Embrionaria, Barcelona, Madrid; ²GINEFIV-Clínica Belén, Madrid; ³Fundación Leonardo Marquès, Barcelona

INTRODUCCIÓN:

Existe cierta controversia acerca de la posible relación entre la presencia de aneuploidías espermáticas y la edad paterna. Mientras que en algunos estudios se encuentra una correlación entre edad y aneuploidías espermáticas (Bosch et al., 2001), en otros no se encuentra tal relación (Wyrobek et al., 2006; Martin et al., 1995; Luetjens et al., 2002). Publicaciones recientes sugieren que las aneuploidías en los espermatozoides pueden estar predeterminadas desde el desarrollo fetal por exposición a disruptores endocrinos (Skakkebaek et al., 2005) y que, por lo tanto, la tasa de aneuploidías en espermatozoides no debería aumentar con la edad. El objetivo de este estudio fue el de determinar la relación entre la tasa de aneuploidías en espermatozoides y la edad paterna.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se incluyeron un total de 828 muestras de semen procedentes de varones con un cariotipo normal que se encontraban dentro de un programa de reproducción asistida. Se establecieron 3 grupos en función de la edad: 25-35 años, 36-45 años y ≥ 46 años. Las muestras de semen se fijaron para su análisis mediante la técnica de FISH. Se utilizaron sondas locus-específicas (LSI) para los cromosomas 13 y 21 y sondas centroméricas (CEP) para los cromosomas 18, X e Y. Se analizaron un mínimo de 1000 espermatozoides por ronda de hibridación. El análisis estadístico se realizó mediante el test Chi Cuadrado y el Test de comparación de proporciones, considerando las diferencias significativas cuando $p < 0,05$

RESULTADOS:

El 69,4% de las muestras analizadas presentaron un resultado de FISH normal en espermatozoides (575/828). El porcentaje de varones con FISH alterado fue del 11,1% en el grupo de edades entre 25-35 años, 16,3% en el de 36-45 años y del 3,1% en el grupo ≥ 46 años. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos.

CONCLUSIONES:

Los resultados de este estudio indican que la tasa de aneuploidías en espermatozoides no aumenta con la edad. Con el fin de confirmar estos resultados es recomendable realizar una serie con un mayor número de casos.

076: ESTUDIO DEL PAPEL DE LA DIVISIÓN TEMPRANA Y SU RELACIÓN CON LA EDAD DE LA PACIENTE Y LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA

A. Ortiz, F. Monllor, I. M. Baena, G. Lozano, M. I. Jiménez.
 Centro Extremeño De Reproducción Humana Asistida (CERHA). Hospital Materno Infantil. Badajoz

INTRODUCCIÓN:

Son numerosos los artículos que destacan la importancia de la división

temprana (DT) como indicador de implantación embrionaria y embarazo. Algunos autores atribuyen las primeras divisiones mitóticas del embrión a la

activación de factores maternos en el ovocito. Nosotros nos hemos propuesto estudiar si existe relación entre la división temprana y la edad de la

paciente. También nos hemos planteado la posibilidad de que la división temprana pueda estar influida por el tipo de hormonas empleado en la estimulación ovárica.

MATERIAL Y MÉTODOS:

De los ciclos FIV-ICSI realizados entre noviembre de 2008 y abril del 2009 se seleccionaron aquellos en los que se comprobó la aparición o no de división temprana entre las 25-27 horas tras inseminación. En total fueron 165 pacientes, con edades comprendidas entre 26 y 42 años, de las cuales 120 fueron estimuladas mediante protocolo con antagonistas de la GnRH, y 45 mediante protocolo con agonistas.

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS 15.0 para Windows. Se buscó relación entre presencia o no de división temprana y el tratamiento previo de estimulación, así como con la edad de la paciente.

DIVISIÓN TEMPRANA (DT)	NO	EDAD	
		MENOR DE 30 AÑOS	MAYOR DE 30 AÑOS
	SI	6 (31,6%)	64 (43,8%)
Total		19	146

RESULTADOS:

No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre la presencia o no de división temprana y la edad de la paciente. Tampoco encontramos diferencias entre el grupo de pacientes estimuladas con agonistas y el grupo de pacientes estimuladas con antagonistas.

Estudiando la tasa de gestación en estas pacientes vemos que hay mayor número de embarazos en aquellas que presentan división temprana (57,8%) con respecto a las que no (42,2%) ($p = 0,021$).

DIVISIÓN TEMPRANA (DT)	NO	ESTIMULACIÓN	
		AGONISTAS	ANTAGONISTAS
	SI	26 (57,8%)	69 (57,5%)
Total		45	120

CONCLUSIONES:

Verificamos que la aparición de división a las 25-27h post-inseminación es marcador de buen pronóstico, por lo que puede servir de herramienta para elegir embriones a transferir de la misma categoría.. No parece que la edad de la paciente influya en la activación de los mecanismos que desencadenan las primeras divisiones mitóticas en el embrión. El tratamiento hormonal empleado en la estimulación ovárica no afecta a la presencia o no de división temprana.

077: ¿ES VIABLE LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA ANTES DE LA CONGELACIÓN EN DONANTES DE SEMEN?

G. López, R. Lafuente, J. Canals, D. Rey, M. Brassesco.
CIRH Clínica Corachan, Barcelona

INTRODUCCIÓN:

Tras un periodo de prueba en nuestro laboratorio, en el que se utilizan muestras de donante capacitadas y congeladas para inseminación, se pretende valorar su efectividad frente a las muestras congeladas según el método tradicional.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se realiza estudio retrospectivo desde el año 2008 hasta abril del 2009. Se estudian un total de 258 ciclos de inseminación con donante, de los cuales:

- Grupo I: $n=215$ (83.3%) ciclos realizados con muestra congelada tras su recogida en fresco y capacitada tras descongelación, y

- Grupo II: $n=43$ ciclos (16.7%) ciclos realizados con muestra capacitada tras su recogida en fresco y congelada posteriormente. El medio utilizado en este último grupo fue SpermCryoprotect II (Nidacon®).

Se han tenido en cuenta los siguientes parámetros para realizar el estudio: edad de la paciente, nº embarazos y nº embarazos evolutivos. Se controlaron también variables como el tipo de medicación y el resultado de espermatozoides A+B en el post-capacitado.

Se realiza estudio estadístico mediante programa PASW Statistics 17.0.

RESULTADOS:

Se compara el porcentaje de embarazo

evolutivo en cada grupo (Grupo I: 12.1% vs. Grupo II: 17.2%), siendo mayor el porcentaje en el grupo de muestras capacitadas antes de la congelación.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos en cuanto a la edad de las pacientes.

CONCLUSIONES:

Aunque se trata de un estudio preliminar, la opción de congelar las muestras capacitadas parece ser efectiva teniendo en cuenta los resultados. Además se logra mejorar de forma importante la gestión del banco de esperma, ya que se reduce el volumen de pajuelas a congelar y se facilita la preparación de las muestras en el día de la inseminación.

078: UTILIDAD DE LA DETERMINACIÓN DE PAPP-A DURANTE EL PRIMER TRIMESTRE DE EMBARAZO COMO FACTOR DE RIESGO RELACIONADO CON EL ABORTO

I. Peral Camacho, R. Ruiz Macias, M. M. Viloría Peñas, A. Moro Ortiz.
Servicio de Bioquímica Clínica. Hospital Universitario de Valme. Sevilla

INTRODUCCIÓN:

Durante el embarazo, feto y placenta sintetizan distintas proteínas y esteroides (Proteína Plasmática Asociada al Embarazo - PAPP-A; Gonadotropina Coriónica Humana - HCG; Alfa Fetoproteína - AFP, Inhibina A, Estriol Libre...) que se han utilizado para monitorizar distintos aspectos de la gestación. En el Área Hospitalaria de Valme (Sevilla), está implantado desde el año 2005 un Programa de Cribado Prenatal de Aneuploidias. Este programa se basa en la realización de un Cribado Combinado de Primer Trimestre (determinamos las concentraciones de PAPP-A, Beta-HCG libre y medimos Translucencia Nucal - TN). A partir de la base de datos que hemos configurado estos años nos hemos planteado ver la relación entre estos parámetros y otros que tenemos recogidos (semana de gestación, edad materna...) y el riesgo de aborto.

MATERIAL Y MÉTODOS:

- Se han estudiado entre enero 2005 y diciembre 2007 un total de 12918 embarazadas que se encontraban el primer trimestre de gestación.

- De cada gestante se han recogido: edad y edad gestacional en el momento de la muestra; medidas de PAPP-A, Beta HCG libre y TN; medidas expresadas como múltiplos de mediana (MoM) para la semana de gestación de estos mismos parámetros; si se ha producido aborto no voluntario o si la gestación ha llegado a término.

- Las determinaciones bioquímicas se realizaron en un analizador Inmulite 2000 (Siemens) que utiliza un ensayo inmunométrico quimioluminiscente en fase sólida. La medición de la TN se realizó en ecógrafos de alta resolución y por ecografistas autorizados (según normas de Fetal Test Foundation).

- Para el cálculo de los MoM se utilizó el software Prisca V 4.0 (Siemens).

-Análisis estadístico: las variables se resumieron con medias y desviaciones típicas o si las distribuciones eran asimétricas con medianas y percentiles. Para relacionar la variable dependiente aborto (si/no) con las variables predictoras se generó un modelo de Regresión Logística Binaria que permitió el cálculo de las odds ratio y de sus respectivos intervalos de confianza al 95%.

RESULTADOS:

De los 12918 embarazos controlados 657 (5,1%) terminaron en aborto espontáneo y 12261 (94.9%) llegaron a término.

Las variables cuantitativas se resumieron al seguir distribuciones asimétricas por medianas y percentiles (P25 y P75).

Se estableció que sólo la edad materna y los MoM corregidos de PAPP-A se asociaban con la variable dependiente aborto (en ambos casos con una $P < 0,0005$).

PAPP-A: Odds Ratio 1.1 con un intervalo de confianza al 95% de 1.03-1.17

Edad Materna: Odds Ratio 1.07 con un intervalo de confianza la 95% de 1.05-1.08

CONCLUSIONES:

- Tal como se describe en la bibliografía, los valores de beta HCG libre no se relacionan caso con un mayor riesgo de aborto.

- Por el contrario los niveles de PAPP-A si están asociados junto a la edad materna con un mayor riesgo de

perdida gestacional. Esta asociación se da únicamente cuando consideramos los MoM corregidos y no la concentración como tal de la PAPP-A. Tal como refleja la bibliografía unos niveles bajos de PAPP-A condicionan por la actividad proteasa de esta sobre el complejo IGF- BP unos bajos niveles de los factores de crecimiento IGF-I e IGF-II que podrían condicionar entre otros efectos adversos un mayor riesgo de aborto.

- Observamos que menor edad gestacional en el momento del cribado se asociaba a mayor riesgo de aborto. Probablemente es un sesgo del estudio ya que no por hacerse las determinaciones en un semana más inicial hay más riesgo de aborto. Como es sabido en esas primeras semanas se produce un mayor número de abortos espontáneos por lo que aquellas mujeres que se estudian más tardíamente dentro de este primer trimestre tienen menor probabilidad de abortar.

079: CALIDAD OVOCITARIA Y EMBRIONARIA EN PACIENTES CON SOPQ

E. Suárez, F. Garrido, A. Luengos, C. Fernández Fernández, B. Suárez Álvarez. Centro Ginecológico de León

INTRODUCCIÓN:

El Síndrome de ovario poliquístico (SOPQ), es el trastorno endocrino-reproductor más frecuente en mujeres en edad fértil. Su prevalencia se cifra entre un 5-10%. Alrededor de un 60% de estas mujeres tienen problemas de esterilidad de origen anovulatorio.

SOPQ se asocia a una alta recuperación de ovocitos, calidad ovocitaria pobre, baja tasa de fecundación y un riesgo incrementado de abortos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio descriptivo retrospectivo realizado en el Centro Ginecológico de León durante los años 1999 y 2007.

En el grupo de estudio se incluyen 23 pacientes con SOPQ (Criterios analíticos, ecográficos y clínicos) a las que se realizaron 30 ciclos.

El grupo control esta constituido por 30 pacientes con diagnóstico de Factor masculino.

El análisis estadístico se realiza con el programa SPSS 12.

RESULTADOS:

MORFOLOGÍA OVOCITARIA y EMBRIONARIA

La tasa de fecundación, desarrollo y tasa de embarazo fue similar en pacientes SOPQ y en pacientes normovuladoras, independientemente de la causa de infertilidad.

Morfológicamente el grado de todos los ovocitos maduros fue:

.144 ovocitos eran normales (54.5%)

.87 ovocitos presentaron una anomalía (33%)

. 33 ovocitos presentaron más de una anomalía (12.5%)

No existen diferencias en cuanto a los dos grupos de pacientes.

La tasa de inmaduros es mayor en pacientes con SOPQ.

La tasa de fecundación es menor en estos pacientes.

TASAS DE FECUNDACIÓN, EMBARAZO, ABORTO...

. SOPQ precisaron menos medicación y la media de ovocitos recuperados fue mayor .

. La tasa de MII, de vesículas germinales y de fecundación fue similar en los dos grupos. (PCOS muestra un nº mayor de ovocitos fecundados, pero esto se debe a que la recuperación también es mayor).

. La tasa de embarazo y de embarazo múltiple fue similar en ambos grupos.

. La tasa de aborto fue más baja en el grupo control

FIV FRENTE A ICSI EN SOPQ:

La tasa de fecundación fue menor en los COC inseminados por FIV que en los microinyectados (Fallo de Fiv del 15%).

ASPECTOS GENÉTICO

Baja calidad ovocitaria y embrionaria ha sido estadísticamente relacionada con altas tasas de aneuploidia.

Estudio genético de los ovocitos:

La tasa de fecundación fue más baja en pacientes con SOPQ a pesar de que la tasa de recuperación fue mayor. Los análisis citogenéticos se realizaron en los ovocitos no fecundados y normales morfológicamente. Se analizaron 74 óvulos de pacientes con SOPQ y 73 de pacientes control, y no se encontraron diferencias significativas

Estudio genético de los embriones:

Se analizaron los embriones por hibridación in situ para los cromosomas X, Y,13, 15, 16, 17, 18, 21 y 22.

Las pacientes con SOPQ necesitaron menos dosis de medicación, y produjeron un mayor número de ovocitos. El análisis genético de los embriones reveló que en pacientes con PCOS el % de embriones euploides es similar al del grupo control, aunque el número absoluto de embriones euploides y aneuploides fue significativamente mayor en pacientes con SOPQ.

Al hacer el estudio por edades, las pacientes con SOPQ < 38 años, mostraron una tasa de embriones euploides similar a la de pacientes control. En pacientes ≥ 38 si se observó un mayor número de embriones euploides que en el grupo control

CONCLUSIONES:

1- La tasa de recuperación de ovocitos es mayor en estas pacientes, pero la tasa de inmaduros también es mayor. Esto explicaría porque la tasa de fecundación por FIV es menor que en el grupo control; pero al realizar ICSI la tasa de fecundación es similar.

2- En cuanto a la calidad de los ovocitos y embriones no hay diferencias significativas.

3- La tasa de embarazo por embrión transferido o por paciente es similar en ambos grupos, pero la tasa de aborto si es mayor en estas pacientes. Así mismo la tasa de implantación también es menor, ya que el nº de embriones transferidos en estas pacientes es mayor.

4- Pacientes SOPQ con altas respuestas a las gonadotropinas producen más embriones aneuploides y euploides. Esto podría ser la causa de la alta incidencia de abortos espontáneos asociados a esta patología, más que el grado de

inmadurez del ovocito.

Los altos niveles de LH parecen afectar a la fecundación y al grado de madurez de

los ovocitos.

La presencia de Hiperandrogenemia (incremento en la expresión de los

receptores de andrógenos) en las células epiteliales endometriales parece estar asociado a fallos de implantación y a abortos espontáneos.

O80: ESTUDIO COMPARATIVO DE SÉMENES PATOLÓGICOS FRENTE A BIOPSIAS DE TESTÍCULO.

E. Huguet, M. Testillano, D. Becerra, M. Alonso, C. López, Y. Mínguez, C. Bou, D. Agudo.
IVI Madrid

INTRODUCCIÓN:

Se han analizado los resultados de IVI Madrid en ciclos de ICSI con muestras de semen "patológicas" en fresco y descongeladas en las que solo se pudo realizar un lavado, y las comparamos con los datos de ciclos de biopsia de testículo en fresco y descongelada de los años 2007 y 2008. Además analizamos el empleo de pentoxifilina (ptx) en este tipo de muestras.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se incluyeron 187 casos de biopsia de testículo (33 en fresco y 154 congeladas) y 221 casos de muestras de semen de muy baja calidad (188 en fresco y 33 congeladas) que recibieron tratamiento entre 2007 y 2008 en nuestra clínica. Ambos tipos de muestras se lavaron con HTF, centrifugando 5min a 2000rpm, y resuspendiéndolas en poco volumen (0.2-0.3ml aproximadamente) de HTF. En ningún caso se incluyeron muestras de semen destinados a ciclos de ovodonación. El análisis estadístico se realizó empleando el test chi-square.

RESULTADOS:

CONCLUSIONES:

Según los resultados obtenidos, podemos concluir que los mejores resultados se obtienen en los casos en los que el ciclo se realiza con muestra de biopsia de testículo en fresco, su posterior congelación merma los resultados en 10 puntos, tanto en tasa de gestación clínica como de implantación. Los cual se repite en el

caso de muestras de semen de baja calidad aunque no de una manera tan acusada. En función del número de espermatozoides, destacan los pobres resultados en los casos en los que se congelaron muestras con menos de 200.000 esp/ml, lo que nos hace plantearnos no congelar este tipo de muestras, salvo en casos excepcionales, y recurrir a muestras en fresco para futuros ciclos. Además en el caso de muestras solo lavadas, existe una correlación casi significativa ($p=0.07$) si la muestra presenta más de 200.000 esp/ml con altas tasas de gestación e implantación, respecto a muestras con menos de 200.000 esp/ml.

El empleo de pentoxifilina en casos de biopsia en fresco está asociado a biopsias de mala calidad, por lo que los resultados son menores que en los casos en los que no necesitamos emplearla, siendo

recomendable su uso en las biopsias congeladas, ya que nos permite elegir espermatozoides de mejor calidad.

Existe una correlación estadísticamente significativa cuando comparamos los resultados de muestras de semen solo lavadas con y sin ptx ($p=0.01$), de tal manera que cuando en este tipo de muestras necesitamos usar ptx no tenemos gestaciones, recomendándose biopsia de testículo en fresco para asegurar mejores resultados.

	SEMEN SOLO LAVADO		BIOPSIAS TESTÍCULO	
	FRESCA	CONGELADA	FRESCA	CONGELADA
n	188	33	33	154
T.G.C	43,57	40,70	55,56	45,19
T.I	28,70	20,37	40,38	31,06
SEMEN SOLO LAVADO				
	semen fresco		semen congelado	
	>200.000 csp/ml	<200.000 csp/ml	>200.000 csp/ml	<200.000 csp/ml
n	94	94	11	22
T.G.C	49,41	37,18 p=0.09	55,56	33
T.I	34,32	22,58 p=0.07	25	17,65
	BIOPSIAS FRESCO		BIOPSIAS CONGELADA	
	con ptx	sin ptx	con ptx	sin ptx
n	10	23	100	54
T.G.C	42,86	60	42,05	51
T.I	30,77	43,39	31,98	29,36
	SEMEN LAVADO FRESCO		SEMEN LAVADO CONGELADO	
	con ptx	sin ptx	con ptx	sin ptx
n	7	181	9	24
T.G.C	0	45,22 p=0.01	33,33	44,44
T.I	0	29,81	15,79	22,86

081: ACUMULACIÓN DE OVOCITOS EN PACIENTES DE EDAD MATERNA AVANZADA

F. Bronet, L. Herrero, R. Herrer, E. Martínez, M. Ariza, M. Gaytán, A. Liñán, C. Losada, S. Pareja.

IVI Madrid

INTRODUCCIÓN:

Las pacientes de edad materna avanzada constituyen un grupo de pacientes con una tasa de éxito muy limitada en técnicas de reproducción asistida (TRA). Generalmente en este tipo de pacientes la respuesta a la estimulación ovárica es pobre, por lo que no se recupera un gran número de ovocitos tras la punción ovárica. Por otra parte, cuando se aplican técnicas de Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) es muy recomendable disponer del máximo número de embriones para biopsiar con el fin de tener más embriones normales genéticamente y poder seleccionar embriones en función de su morfología en el mismo ciclo. Por lo tanto parece lógico pensar que mediante la acumulación de ovocitos tras varios ciclos de TRA obtendremos una mejora en los resultados, ya que dispondremos de más embriones con los que trabajar. La pregunta que nos hacemos es si esta estrategia es más efectiva o no que realizar varios ciclos independientes con DGP.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se han incluido en este estudio 48 pacientes, en el período de tiempo

	VITRI	FRESCO	p
Tamaño muestral	48	17	
Media de edad	41,2	42,0	NS
Media de ciclos	2,7	2,4	NS
Nº Transferencias (%)	29,2	22,5	NS
Media de embriones transferidos	1,1	1,1	NS
TGBq (%)	35,7	11	NS
TGC (%)	35,7	11	NS
TI (%)	31,2	10	NS
TA (%)	20	0	NS
Gemelar (%)	0	0	NS
T. Gestación Evolutiva /transfer (%)	28,6	11	NS

comprendido entre enero de 2008 y marzo de 2009, del programa de DGP por edad materna avanzada que acumularon ovocitos mediante vitrificación y que posteriormente desvitrificaron y realizaron DGP. Como grupo control se emplearon 17 pacientes que obtuvieron 5 o menos ovocitos en punción, y realizaron más de un ciclo durante este período de tiempo, es decir, al menos realizaron dos ciclos de DGP sin ningún tipo de acumulación. Las medias se estudiaron mediante una Anova de un factor y las

tasas fueron analizadas mediante una T de Student, con el programa SPSS.

RESULTADOS:

CONCLUSIONES:

Aunque no se encuentran diferencias significativas en ningún parámetro, existe una clara tendencia al aumento de las tasas de gestación e implantación después de acumular ovocitos. Se ha de incrementar el tamaño muestral de estos grupos con el fin de aclarar si estas tendencias finalmente se confirman o por el contrario las diferencias se diluyen.

082: ¿EXISTE MEJOR CALIDAD EMBRIONARIA CON FIV CONVENCIONAL?

X. Blanch, M. Brossa, A. Yus, M. Antich.

FERTILAB. Institut Català de Fertilitat, Barcelona

INTRODUCCIÓN:

En nuestro laboratorio seguimos realizando la FIV convencional siempre que el caso lo permita, pero no como técnica única de inseminación (50%ICSI y 50%FIV). Realizar las dos técnicas nos asegura la fecundación en los casos en que pudiera producirse un fallo de FIV o una fecundación anómala.

El objetivo de este estudio es observar si existen diferencias en la calidad

embrionaria (según criterios ASEBIR) entre los embriones procedentes de ICSI y los de FIV convencional, tanto en día 2 como en día 3 para ver si la técnica de fecundación influye en la calidad de dichos embriones.

MATERIAL Y MÉTODOS:

En este estudio retrospectivo a partir de un total de 1.753 cigotos. De los 1322 embriones procedentes de ICSI, 690 siguieron en cultivo hasta día 3 y de los

431 embriones inseminados con FIV convencional 176 continuaron hasta día 3.

La inseminación o la ICSI se realizaron entre las 5-7 horas desde la recuperación ovocitaria. La fecundación se valoró a las 16-20 horas, la calidad embrionaria en día 2 a las 44 horas, y en día 3 a las 67 horas post inseminación.

En la FIV convencional se utilizan placas de 4 pocillos (Nunc embriotestadas) en medio IVF (Medicult) a una

concentración de 300.000 espermatozoides GIII /ml (máximo 6 oocitos/pocillo). En Fertilab desde hace más de 10 años no realizamos incubación overnight sino que retiramos los óvulos a las 3 y 5 horas post inseminación, lavamos en un pocillo con medio limpio abundante y pasamos los oocitos a microgotas de medio de cultivo (G1 serie 5, Vitrolife) observándose una tasa similar a la de ICSI.

RESULTADOS:

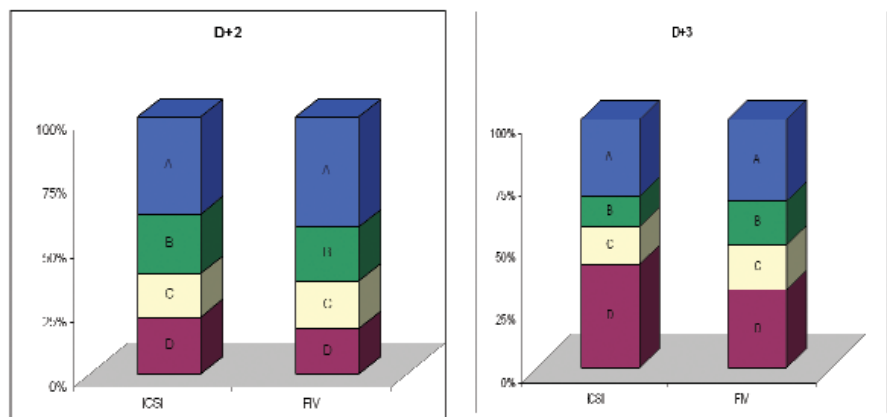
Los resultados nos muestran una alta proporción de embriones óptimos (A+B) en día 2, tanto en ICSI (61%) como en FIV (64%) Fig. 1. En día 3 disminuye el porcentaje de embriones óptimos con respecto día 2, observándose mayor proporción de embriones óptimos (A+B) en FIV convencional (Fig. 2). (43% vs. 51%) La disminución de embriones óptimos en día 3 respecto día 2, corresponde mayoritariamente a embriones que no han seguido el ritmo de división adecuado.

CONCLUSIONES:

En día 2 no parece existir diferencias en la calidad de los embriones obtenidos entre ambas técnicas (FIV e ICSI). En cambio en día 3 parece evidenciarse una tendencia a obtener mayor porcentaje de embriones óptimos con FIV convencional. Este hecho nos hace plantearnos si deberíamos modificar la proporción de oocitos inseminados a favor de la fecundación más fisiológica es decir la FIV clásica, siempre y cuando la calidad seminal y el número de óvulos lo permitan.

Así mismo corroboramos la práctica habitual de aconsejar a nuestros ginecólogos el cultivo embrionario hasta día 3, sobre todo cuando dispongamos de embriones suficientes para realizar una mejor selección embrionaria en el momento de la transferencia.

Los gráficos nos muestran el porcentaje calidad embrionaria ASEBIR en cada una de las técnicas, tanto en día 2 como en día 3.



083: EL HATCHING ASISTIDO BENEFICIA A LAS PACIENTES CON BAJA RESPUESTA

S. Camacho, V. Badajoz, M. C. Cañadas, M. De La Casa, A. R. Díaz, J. Gragera, I. Lozano, L. Martínez, C. Urda, J. Gijón, M. Alcaraz, R. Bonache, J. Rodríguez, C. Pérez, A. Martínez de Arenaza
GINEFIV, Madrid

INTRODUCCIÓN:

Las pacientes con Baja Respuesta ovárica se caracterizan por tener unos niveles de FSH basal elevados. A su vez, estos niveles de FSH son consecuencia de un envejecimiento ovárico que puede afectar a la calidad ovocitaria y, por tanto, a un deterioro de sus estructuras, entre ellas la zona pelúcida.

Para que se dé el proceso de implantación, el blastocisto debe eclosionar al llegar al útero y que se produzca la unión entre las células del trofoblasto y las células del endometrio. Si la zona pelúcida del ovocito se encuentra afectada, es posible que la tasa de gestación de este tipo de pacientes disminuya debido a la imposibilidad de eclosionar del blastocisto.

Cohen y cols (*) demostraron que este tipo de pacientes se veían beneficiadas por la realización de un orificio en la zona pelúcida de los embriones (Assisted Hatching) previa a la transferencia de los mismos.

MATERIAL Y METODOS:

Estudio transversal retrospectivo aleatorizado y unicéntrico, donde se seleccionan al azar 40 pacientes con FSH basal mayor de 10 que se hayan realizado un ciclo de Fecundación in Vitro (FIV convencional, ICSI o técnica MIXTA) con ovocitos propios en el periodo comprendido entre enero de 2006 y

diciembre de 2007. La media de edad de las pacientes es de 35,7 ± 3,7 años.

Hatching asistido de tipo Químico, mediante el uso de una solución de ácido Tyrode en Día+3 post inseminación, 30 minutos antes de la transferencia.

GRUPO A: CON HATCHING: 18 pacientes.

GRUPO B: SIN HATCHING: 22 pacientes

Se comparan las tasas de gestación, implantación y aborto en ambos grupos.

RESULTADOS:

	Age	Oocytes retrieved	Oocytes inseminated	Embryo Transfer	% βHCG Pregnancy	% Clinical Pregnancy	% Implant	% miscar.
Gr. A	35.6±3.6	5.7±2.1	4.6±1.45	1.9±0.7	44.4 (8/18)	38.88 (7/18)	25.7 (9/35)	14.3 (1/7)
Gr. B	35.8±3.8	7.4±4.0	5.5±2.5	2.0±0.7	45.4 (10/22)	31.8 (7/22)	18.2 (8/44)	14.3 (1/7)

CONCLUSIONES:

La realización de la técnica de Hatching Asistido previa a la transferencia en pacientes con FSH basal elevada aumenta su tasa de gestación e implantación respecto a las pacientes a

las que no se les realiza.

Por tanto, los niveles de FSH, son importantes a la hora de valorar la realización de Hatching Asistido de manera rutinaria en el laboratorio de FIV.

BIBLIOGRAFIA:

(*) Cohen J, Alikani M, Trowbridge J et al. Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. Hum Reprod. 1992 May; 7(5):685-91.

084: DGP MOLECULAR DIRECTO VERSUS DGP MOLECULAR INDIRECTO: APLICACIONES, VENTAJAS, INCONVENIENTES Y CASOS CLÍNICOS

T. M. Alberola¹, X. Vendrell¹, R. Bautista-Llácer¹, M. Pardo¹, M. Pérez-Alonso².

¹Unidad de Genética Reproductiva, Sistemas Genómicos S.L. València.

²Dirección Científica, Sistemas Genómicos S.L., València.

INTRODUCCIÓN:

En el Laboratorio de DGP Molecular las estrategias de trabajo deben cumplir las condiciones de:

Rapidez: la transferencia embrionaria debe realizarse entre los días +4 y +5.

Sensibilidad: el diagnóstico se realiza a partir de una única célula embrionaria

Robustez: para diagnosticar el mayor número posible de embriones

Fiabilidad: La tasa de error de diagnóstico debe ser lo más baja posible

Se pueden distinguir dos tipos de aproximaciones en el DGP molecular: los estudios directos y los indirectos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

En ambos tipos de estudios se utiliza la PCR heminested fluorescente. En los métodos directos se amplifica la región a estudiar y dos marcadores microsatélite (STRs) informativos en la pareja, uno a

cada lado del gen como apoyo al diagnóstico. La detección de la mutación se realiza por análisis de fragmentos o miniselección dependiendo del tipo de mutación. En el caso de estudios indirectos se amplifican cuatro STRs informativos en la familia, dos a cada lado del gen al que está ligado la enfermedad.

RESULTADOS:

En nuestro laboratorio utilizamos los métodos directos siempre que el caso lo permite y utilizamos únicamente los estudios indirectos cuando los directos no son factibles como en los siguientes casos:

Grandes deleciones/inserciones

Regiones ricas en G/C refractarias a la amplificación

Presencia de pseudogenes con una similitud elevada al gen a estudiar

Cuando se conoce el gen causante de la enfermedad pero no la mutación concreta

Tipaje HLA

En estudios de exclusión

Presentamos casos clínicos de nuestro laboratorio como ejemplo de cada estrategia.

CONCLUSIONES:

Para la realización del DGP molecular es imprescindible que la pareja tenga un diagnóstico genético de la enfermedad.

Las ventajas de la utilización de los métodos directos respecto a los indirectos son:

Menor tasa de error de diagnóstico que es <1% si se utilizan dos STRs de apoyo

No son necesarios 4 STRs informativos

El estudio de informatividad se puede realizar con menos familiares disponibles

La única desventaja de los métodos directos es que cada pareja requiere una puesta a punto en el laboratorio específica para su caso.

085: INCIDENCIA DE ALTERACIONES GENÉTICAS EN DONANTES DE OVOCITOS.

R. Morales¹, B. Lledó¹, J. A. Ortiz¹, J. Quintana², R. Bernabeu²

¹Instituto Bernabeu Biotech, Alicante; ²Instituto Bernabeu, Alicante

INTRODUCCIÓN:

Debido a la severidad y la alta prevalencia en la población general de determinadas alteraciones genéticas como la fibrosis

quística (FQ) y el síndrome de X-frágil se decidió realizar estas pruebas a las candidatas del programa de donación de ovocitos de nuestro centro. El objetivo fue establecer la incidencia de portadoras de

estas y otras alteraciones genéticas en la población de donantes para determinar si está justificada la incorporación de dichas determinaciones en el cribado rutinario al que se someten las donantes.

El síndrome de X-frágil es una de las causas genéticas de retraso mental hereditario más frecuente y la segunda con base genética después del Síndrome de Down. Se trata de una enfermedad dominante ligada al cromosoma X. La causa es una expansión en la región 5' UTR del gen FMR1. Existen 4 alelos: la expansión completa (<200 repeticiones) con manifestaciones clínicas, las formas permutadas (50 – 200 repeticiones) e intermedias (45-50 repeticiones) y las formas normales (<45 repeticiones). Las pacientes portadoras de las formas permutadas e intermedias tienen un riesgo de transmitir la expansión completa a la siguiente generación dando lugar a retraso mental.

La fibrosis quística es una enfermedad hereditaria recesiva que afecta a los pulmones y el páncreas. Es el desorden genético más común en la población caucasiana con una incidencia de 1 en 2.500 y portadores 1 de 25. Debido a la alta incidencia de portadores existe un riesgo elevado de que la descendencia presente una combinación de diferentes mutaciones y variantes del gen CFTR, lo cual podría dar lugar a un fenotipo de Fibrosis Quística.

Además, mediante la realización de un cariotipo podemos detectar anomalías cromosómicas numéricas y estructurales,

y también la presencia de polimorfismos que a pesar de que se consideran variantes sin consecuencias fenotípicas aparentes, en algunos casos se asocian a un mayor riesgo de infertilidad, abortos de repetición y anomalías congénitas en la descendencia.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se han analizado los resultados de X-frágil, FQ y cariotipo de 300 mujeres candidatas para ser incluidas en el programa de donación del Instituto Bernabeu desde enero a mayo del 2009. A partir de linfocitos de sangre periférica se extrajo el ADN que fue empleado para la amplificación y detección de mutaciones en el gen CFTR utilizando el kit comercial CF V.3 (Abbott). Asimismo se realizó la amplificación de las repeticiones CGG de la región 5' UTR del gen FRMR1 (X-frágil) mediante el kit de Abbott. El cariotipo se realizó a partir de un cultivo de linfocitos siguiendo las técnicas clásicas de citogenética.

RESULTADOS:

De las donantes rechazadas por presentar alguna de estas alteraciones, 3 resultaron ser portadoras de mutaciones en el gen CFTR responsable de causar FQ (2 para la F508 y una para

G542X). En cuanto al polimorfismo localizado en el intrón 8, nueve donantes fueron portadoras de la variante 5T.

Respecto al síndrome de X-frágil, 3 donantes resultaron portadoras del alelo permutado del Síndrome X-frágil y 4 portadoras de la forma intermedia.

Se rechazaron tres donantes por presentar alteraciones en el cariotipo. Dos de ellas eran 46,XX,+mar y otra presentaba el polimorfismo 46,XX,inv(9)(p12q13) que se asocia a infertilidad, abortos de repetición y anomalías en la descendencia. Además también se encontraron 2 donantes con un incremento en la heterocromatina centromérica del cromosoma 1, las cuales no se descartaron porque no existe en la bibliografía una asociación clara entre dicho polimorfismo e infertilidad.

CONCLUSIONES:

Debido a la elevada prevalencia de estas alteraciones en las candidatas al programa de ovodonación se recomienda el cribado de las mismas como parte del estudio realizado en donantes de gametos previamente a su inclusión en el programa.

086: ALTO VALOR PREDICTIVO DE UN NUEVO SISTEMA DE SCORING PARA LA VALORACION DE LA MADUREZ OVOCITARIA PREDECUMULACION

A. Rabanal, C. Castelló, A. Busquets, A. Farreras, C. Puche, J. Cooper, J. M. Capdevila, M. López-Teijón, J. G. Álvarez.
Institut Marquès, Barcelona.

INTRODUCCIÓN:

En la actualidad existe escasa información disponible sobre cómo poder predecir la madurez ovocitaria antes de la decumulación. La predicción de la madurez ovocitaria es de gran importancia a la hora de seleccionar los ovocitos para la FIV convencional. En este estudio se describe un nuevo sistema de scoring para predecir la madurez ovocitaria antes de la decumulación.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Un total de 452 ovocitos fueron evaluados en parejas sometidas a ciclos de in vitro en nuestro centro. De estos 452, 127 se obtuvieron de la paciente y 325 eran de donantes de óvulos. Tras la maduración ovocitaria in vitro y antes de la decumulación, un sistema de scoring fue aplicado para predecir la madurez ovocitaria, basado en los siguientes criterios por orden de importancia: (i)

se observa una doble línea de 1-1.5 mm, entre la membrana del ovocito y la corona; (ii) el citoplasma del ovocito ha de ser claro y visible sin tener que expandir las células del cúmulo; (iii) células del cúmulo expandidas (de 5 a 10 veces el diámetro del ovocito); (iv) la corona ha de ser fácilmente dissociable del ovocito; (v) ausencia de inclusiones oscuras en las células del cúmulo. Después de la predicción del grado de madurez ovocitario (vesícula germinal,

metafase I, metafase II) aplicando estos criterios, los ovocitos fueron denudados y el grado real de madurez obtenido.

RESULTADOS:

De los 452 ovocitos evaluados, 401 fueron predecidos como maduros y 51 como inmaduros. De los 401 predecidos como maduros, 400 fueron confirmados como maduros después de la decumulación (99,7% valor predictivo positivo). De los 51 predecidos como inmaduros, 46 fueron confirmados como inmaduros después de

la decumulación (90% valor predictivo positivo). De los 46 ovocitos inmaduros evaluados, 26 se encontraban en estadio de metafase I (56,5%) y 20 en estadio de vesícula germinal (43,5%). El análisis estadístico mediante el test de correlación de Pearson indica que existe una correlación estadísticamente significativa entre la predicción de la madurez ovocitaria predecumulación y el valor real observado tras la decumulación, tanto en el grupo de ovocitos maduros como en el de inmaduros ($p < 0.001$).

CONCLUSIONES:

Los resultados de este estudio muestran que este nuevo sistema de scoring de madurez ovocitaria predecumulación tiene un alto valor predictivo. Por lo tanto, este scoring podría utilizarse para seleccionar ovocitos maduros predecumulación y optimizar las tasas de fecundación en FIV convencional.

087: TÉCNICA DE RESCATE DE ICSI EN DÍA +1 POR FALLO TOTAL DE LA FECUNDACIÓN MEDIANTE INSEMINACIÓN

M. Grossmann, M. C. Pons, I. Solvas, R. Noblom, E. Castellanos, J. Unzueta, J. Nadal.
Centro Medico Teknon, Unitat de Reproducció Assistida, Barcelona

INTRODUCCIÓN:

En un ciclo de FIV la inseminación es el método de fecundación recomendado cuando no hay factor masculino detectable. En esta estrategia, en un 5-10% de los casos se presenta fracaso completo de la fecundación, y ante un fallo total de fecundación hay tres opciones: cancelar el ciclo, reinseminar o realizar ICSI en día+1: sólo esta última ha dado embarazos evolutivos.

Se revisan, retrospectivamente, todos los ciclos de FIV convencional con gametos propios y con fallo total de fecundación entre los años 2000 y 2008, y se describe el rendimiento de la técnica de rescate conocida como ICSI en día+1.

MATERIAL Y MÉTODOS:

La inseminación convencional se realiza overnight en medio FERT/IVF (Vitrolife) en concentraciones de 200.000 - 250.000 espermatozoides/mL. Definimos "fallo total de fecundación" como aquella situación en la que ninguno de los ovocitos maduros muestra signos de fecundación normal (2CP 2PN) entre las 17 y las 20h post-inseminación. Por tanto, excluimos del estudio aquellos casos que presentan

fecundaciones anómalas (1PN, 3PN o >3PN) o sólo indicio de fecundación (2CP).

La edad de las pacientes (28 a 41 años), el número de ovocitos recuperados (3 a 15) y el protocolo de estimulación para estos 20 casos no difieren de los de la población general de nuestras pacientes.

Cuando detectamos fallo total de fecundación y la morfología ovocitaria lo permite programamos ICSI de rescate usando espermatozoides de la misma muestra con la que se inseminó el día anterior. En los dos primeros años (años 2000 y 2001) la microinyección espermática se realizaba lo antes posible (p.ej. 20 horas post-inseminación) aunque después modificamos este esquema y realizamos ICSI unas 24 horas post-inseminación.

Los embriones con 2CP-2PN después de ICSI en día+1 se cultivaron 24h en medio G1 (Vitrolife), se seleccionaron los de mejor desarrollo, a los que se practicó eclosión asistida mediante solución ácida de Tyrode inmediatamente antes de la transferencia ecoguiada.

RESULTADOS:

Los ciclos con fallo total de fecundación por inseminación fueron 20 (un 3% de los 644 ciclos de FIV convencional iniciados) repartidos equilibradamente a lo largo de los años.

Se realizó ICSI en día+1 en 17 de estos casos, y en un único caso tampoco se obtuvo fecundación tras la ICSI en día+1. La tasa de fecundación fue del 62%.

Se pudieron hacer 16 transferencias en las que se transfirieron 35 embriones (media de embriones transferidos de 2,2 y media de blastómeros por embrión transferido de 3,9).

Se obtuvieron 6 determinaciones positivas de bhCG, de las cuales dos no se confirmaron ecográficamente, una fue una gestación ectópica, una fue un aborto de primer trimestre y las dos restantes fueron gestaciones evolutivas con un niño nacido en cada una.

Las tasas de implantación y de gestación a término fueron del 11,4% y del 12,5% respectivamente.

CONCLUSIONES:

1/. Aunque las tasas de fecundación, implantación y gestación evolutiva son

significativamente inferiores a las globales en nuestro centro, el protocolo de ICSI en día+1 se demuestra como una buena herramienta de rescate de los ciclos con fracaso total de fecundación por inseminación.

2/. El éxito de esta técnica depende de la rigurosa selección de los ovocitos no fecundados que serán micrinyectados en día+1.

3/. A pesar de que en la literatura científica existe cierta preocupación por

el riesgo de esta técnica de rescate sobre las anomalías cromosómicas, todos los nacimientos comunicados hasta la fecha son normales.

088: FACTORES PREDICTORES DE GESTACIÓN EN INSEMINACIÓN INTRAUTERINA HOMÓLOGA (IUI-H) Y DE DONANTE (IUI-D).

I. Molina, C. C. Duque, J. Alfonso, J. V. Martínez, V. Montañana, A. Romeu
Unidad de Reproducción Humana Asistida. Hospital Universitario La Fe, Valencia.

INTRODUCCIÓN:

La inseminación intrauterina, siempre que esté indicada, es el paso previo a otras Técnicas de Reproducción Asistida más complejas. La tasa de gestación de esta técnica depende de numerosos factores pero, posiblemente, la muestra seminal y la edad de las pacientes sean los más importantes. La introducción de muestras de semen de donante permite duplicar las tasas de gestación. El objetivo del presente trabajo es determinar los factores predictores de gestación de forma independiente para las muestras con semen homólogo y con semen de donante.

MATERIAL Y METODOS:

Para evaluar estos factores se realizó un estudio retrospectivo de cohortes en el que se incluyeron 1900 ciclos de inseminación intrauterina; 1340 con semen homólogo y 560 con semen de donante, realizados en nuestro centro desde Enero de 2000 hasta Septiembre

de 2006. En ambos casos, se incluyeron variables de la pareja como duración de la esterilidad, edad de la mujer y del varón (solo en IAH), índice de masa corporal, número y diámetro folicular el día de la hCG, niveles de FSH el día 3 del ciclo, unidades de FSH administradas, duración del estímulo y niveles de estradiol y grosor endometrial el día de la hCG. También se incluyeron variables seminales como concentración y motilidad de los espermatozoides antes y después de la capacitación, así como recuento de espermatozoides móviles por mililitro de la muestra capacitada.

RESULTADOS:

La tasa de gestación fue del 10.9% para las muestras homólogas y del 23.9% para las de donante. La incidencia de gestación múltiple fue similar en pacientes tratadas con IAC y con IAD. En las muestras de semen homólogo, la concentración, la motilidad de la muestra en fresco y la duración de la estimulación fueron las únicas variables

que presentaron diferencias significativas entre las mujeres que gestaron y las que no. En las muestras de donante no se observaron efectos de las variables seminales. Las variables que presentaron diferencias significativas en este último grupo fueron la duración de la esterilidad, la edad de la mujer y los niveles de estradiol el día de la hCG.

CONCLUSIONES:

Los factores predictores de gestación en IUI-H serían la concentración y la motilidad en fresco, aunque, la patología de base, tanto masculina como femenina, no permite determinar con suficiente fiabilidad estos factores.

En el caso de la IUI-D, en la que se utilizan muestras seminales procedentes de varones seleccionados, que se suponen de fertilidad probada, los factores asociados a la gestación serían la duración de la esterilidad, la edad de la mujer y los niveles de estradiol el día de la hCG.

089: FACTORES DE RECHAZO MÁS FRECUENTES EN EL PROGRAMA DE DONACIÓN DE SEMEN

E. Sellés, N. Salinas, L. Palomares, B. Losa, N. Garrido, M. Muñoz.
IVI, Alicante

INTRODUCCIÓN:

La clínica IVI-Alicante selecciona donantes de semen para tratamientos de

reproducción asistida en parejas donde el varón tiene problemas de infertilidad principalmente por azoospermia, o en aquellas mujeres sin pareja. Con este fin

la clínica recluta varones sanos manteniendo congeladas sus muestras durante 6 meses en cuarentena antes de ser utilizadas para que no puedan

transmitir ninguna enfermedad en caso de seroconversión. La Ley de Reproducción asistida exige para este tipo de donaciones una serie de requisitos en cuanto a analíticas referentes a enfermedades infecciosas de transmisión sexual y evaluación psicológica, sin embargo no existe una mención específica sobre los resultados genéticos. El objetivo del presente estudio fue conocer cuál es el motivo de mayor rechazo según los distintos parámetros evaluados exigibles o no por la Ley.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se evaluaron 129 donantes con edades comprendidas entre 18 y 35 años.

Los donantes fueron sometidos a una entrevista seguida de unos controles para evaluar su calidad espermática, su capacidad de congelación y descongelación, así como analíticas de sangre y estudio psicológico.

- Entrevista: con inclusión en el historial de sus antecedentes personales y familiares.

- Analíticas de sangre: grupo sanguíneo, factor Rh, detección de sífilis, hepatitis, VIH, citomegalovirus, Neisseria gonorrhoeae y Chlamydia trachomatis.

Los estudios genéticos consistieron en

un screening de Fibrosis quística (FQ) donde se estudiaron en sangre 36 mutaciones del gen de fibrosis quística (CFTR). Y el estudio del Cariotipo mediante el análisis cromosómico de 15 metafases mediante bandas GTG. Estos análisis genéticos fueron realizados en el laboratorio de genética de IVI-Murcia.

- Estudio psicológico: el estado psicofísico de los progenitores donantes debían cumplir las exigencias de un protocolo obligatorio de estudio que incluía sus características fenotípicas y psicológicas.

RESULTADOS:

Un 64% de los donantes fueron rechazados por diferentes motivos. El 89,65% fue por alteraciones en el espermograma. El 7,69% estuvo relacionado con una alteración genética, de donde el 5,13% fue por FQ anormal. Y el 2,56% fue por otros motivos relacionados con una entrevista psicológica no apta o por serologías positivas.

CONCLUSIONES:

La mala calidad espermática en los varones sigue siendo la causa que origina una mayor tasa de rechazo en la selección de donantes de semen, siendo la astenozoospermia el principal motivo.

Astenozoospermia	35 44,87%
Oligoastenozoospermia	17 21,79%
Mala descongelación	9 11,54%
Oligozoospermia	6 7,69%
FQ	4 5,13%
Ilipospermia	3 3,85%
Cariotipo	2 2,56%
Chlamydia	1 1,28%
Psicología no apta	1 1,28%

la FQ es el factor con mayor incidencia dentro de los estudios genéticos que origina una importante tasa de rechazo. De ahí la importancia de que en la batería de analíticas de sangre en los donantes se incluyan estos screening ya que así se pueden detectar estas alteraciones que nos aportan unas donaciones más seguras, ya que alrededor del 3% de la población blanca es portadora de FQ, una alteración genética que se transmite de forma autosómica recesiva. Es por esto que se debe aconsejar en los donantes portadores de la mutación el screening en la pareja para fines reproductivos, ya que en el caso de que los dos progenitores sean portadores de la enfermedad, la probabilidad de tener un hijo afectado son del 25%.

090: COMPARACIÓN ENTRE EL CULTIVO DE EMBRIONES EN INCUBADORES DE SOBREMESA CON 5% DE OXÍGENO E INCUBADORES CONVENCIONALES CON 21% DE OXÍGENO.

M. Ruiz Jorro, E. Ferrer, M. Ferrer, C. Calatayud, M. Vila.
CREA (Centro Médico de Reproducción Asistida) - Valencia

INTRODUCCIÓN:

El cultivo embrionario en atmósferas con un menor porcentaje de oxígeno (O2), podría ser una de las opciones para mejorar la eficacia de los tratamientos de Reproducción Asistida.

La utilización de incubadores no

específicos para el cultivo embrionario es una práctica habitual en los laboratorios de embriología clínica de todo el mundo, siendo utilizados idénticos modelos en otros campos como por ejemplo la microbiología.

Conseguir una atmósfera estable, con un porcentaje del 5% de O2 y un 6% de CO2

y a una temperatura adecuada, es prácticamente imposible, en la rutina diaria de un laboratorio de embriología clínica, si se utilizan estos incubadores convencionales con grandes volúmenes interiores.

Actualmente, existen incubadores específicos para el cultivo de embriones

humanos, especialmente diseñados para mantener estas condiciones ambientales, en volúmenes muy pequeños. Son los llamados incubadores de sobremesa, de carga superior o de tipo "sandwichera".

En este estudio hemos querido comparar el porcentaje de embriones de ratón de la cepa B6C3F1 x B6DF1 que alcanzan el estadio de blastocisto, al ser cultivados en dos tipos diferentes de incubadores de sobremesa y con mezcla de gases (6% CO2 y 5% O2 en aire), respecto al que lo hacen al ser cultivados en un incubador convencional con un 6% de CO2 en aire.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Para cada experimento, se utilizaron 54 embriones descongelados, correspondientes a 6 pajuelas,

conteniendo al menos 9 embriones de ratón de la cepa B6C3F1 x B6DF1, en estadio de pronúcleos. Se repartieron 3 embriones de cada una de las 6 pajuelas, para cada uno de los 3 incubadores. En cada incubador se cultivaron, por tanto, 18 embriones, procedentes siempre a 6 pajuelas diferentes. El mismo experimento se repitió 3 veces.

Los incubadores comparados fueron:

K-SYSTEMS G-85 BENCHTOP INCUBATOR

MINC COOK BENCHTOP INCUBADOR

INCUBADOR CONVENCIONAL HERACELL 150 (3 puertas).

RESULTADOS:

La tasa media de formación de

blastocistos fue similar entre los dos tipos de incubadores de sobremesa comparados, (96,3% vs. 92,6%), oscilando entre un 89% y un 100%.

Los resultados fueron superiores utilizando los incubadores de sobremesa con un 5% de O2, respecto a los obtenidos con el incubador convencional con un 21% de O2 (tasa media de formación de blastocistos de un 79,6%, oscilando entre un 78% y un 83%.

CONCLUSIONES:

El cultivo de embriones de ratón de la cepa B6C3F1 x B6DF1 en incubadores de sobremesa con un 5% de O2, mejora la tasa de formación de blastocistos respecto al cultivo en incubadores convencionales con un 21% de O2.

091: RELACIÓN DE LA CALIDAD EMBRIONARIA CON LA CALIDAD SEMINAL

A. Brotons; M. I. Moragues; A. A. Fernández-Peinado
Clínica In Vitam Centro de Medicina Reproductiva, Elche

OBJETIVO:

El objetivo de este trabajo es relacionar las calidades embrionarias de nuestro laboratorio con las calidades seminales de las que partíamos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

nuestro grupo de estudio estaba formado por 14 pacientes de entre 33 y 42 años de edad con una respuesta normal al tratamiento hormonal, a las cuales se les realizaron los pertinentes análisis hormonales, de serología y revisión ginecológica previas. En todos los casos el protocolo de estimulación fue corto con antagonistas y se realizó ICSI en todos los ovocitos maduros. Se realizó la transferencia de los mejores embriones en día 2. Los embriones sobrantes se congelaron mediante vitrificación.

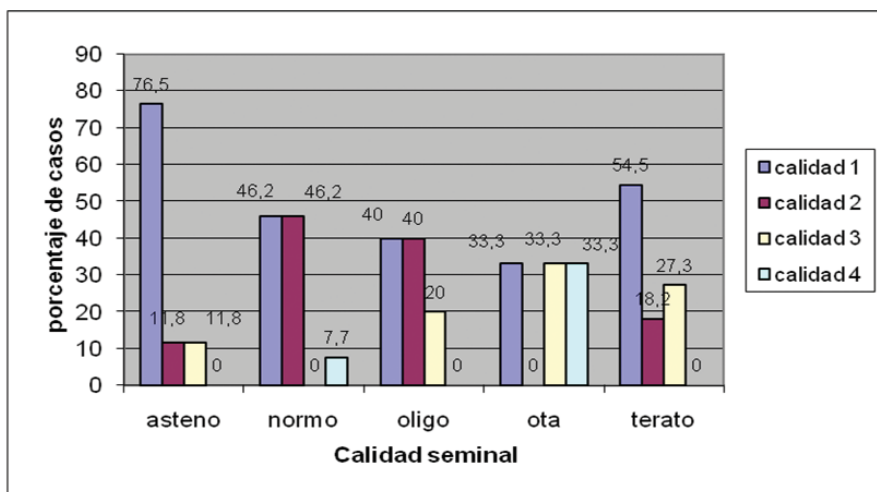
La calidad embrionaria se estudió en día 2 siguiendo la clasificación de Remohí (2005):

Grado I: Calidad embrionaria excelente. Preembriones con zona pelúcida íntegra, blastómeras simétricas, sin fragmentación ni vacuolas.

Grado II: Buena calidad embrionaria. Zona pelúcida íntegra, blastómeras simétricas, con menos del 10 % de fragmentación, sin vacuolas.

Grado III: Calidad embrionaria regular. Zona pelúcida deformada, blastómeras asimétricas y con vacuolas y de un 10 a un 50 % de fragmentación.

Grado IV: Embriones de mala calidad. Zona pelúcida deformada, blastómeras asimétricas y con vacuolas y más de un 50 % de fragmentación.



RESULTADOS:

De todos los embriones obtenidos, el 56 % eran de calidad embrionaria 1, el 24% de calidad 2, el 14% de calidad la 3 y el 4% de calidad 4. El 46.2 % de los embriones obtenidos a partir de sémenes normozoospermicos eran de calidad 1 y el 46.2% de calidad 2. Al partir de sémenes oligozoospermicos obteníamos un 40% y

un 40% de embriones de calidad 1 y 2 respectivamente. El 76.5 % de los embriones obtenidos con sémenes astenozoospermicos y el 54.5 % de los obtenidos con sémenes teratozoospermicos eran de calidad 1. Sólo vimos disminuida levemente la calidad embrionaria con los sémenes con OTA, con los que sólo conseguimos el 33.3% de calidad 1.

CONCLUSIONES:

Sólo en el caso de sémenes con OTA vemos disminuida la calidad embrionaria. En el resto de casos los embriones de calidad 1 y 2 superan con creces al número de embriones de mala calidad.

092: TRANSFERENCIA EMBRIONARIA EN DÍA 3 VERSUS DÍA 5

M. A. Carracedo, J. Guerrero, A. Rodríguez-Arnedo, A. Vieira, R. Bernabeu, J. Ten
Instituto Bernabeu, Alicante

INTRODUCCIÓN:

Teóricamente, la transferencia en estadio de blastocisto ofrece ventajas respecto al estadio de células: mejores tasas de implantación, menor número de embriones a transferir, mejor selección embrionaria, sincronización entre el embrión y el endometrio y, en el caso del diagnóstico genético preimplantacional (DGP), prolongar el cultivo hasta tener el diagnóstico de los embriones. La mejora de los medios de cultivo secuenciales ha llevado a muchos centros a cambiar su política de transferencia hasta el estadio de blastocisto.

Sin embargo, la transferencia en blastocisto tiene sus limitaciones. Existe un riesgo de cancelación del ciclo por no transferencia. Las tasas de gestación acumuladas por ciclo (transferencia en fresco más transferencia de criopreservados) pueden verse disminuidas, bien por no tener la posibilidad de congelar embriones, bien porque los embriones en estadio de blastocisto no sobreviven a la congelación-descongelación. El objetivo de este estudio consiste en determinar qué día es el más apropiado para la transferencia embrionaria: estadio de células (día 3) o estadio de blastocisto (día 5).

MATERIAL Y MÉTODOS:

Análisis retrospectivo de 105 ciclos de FIV/ICSI con transferencia de dos embriones, realizados en el año 2008 en nuestro Centro. Se establecen dos grupos de estudio: grupo A (n=31): ciclos transferidos en día 3 con al menos 3 embriones categoría A (criterios ASEBIR) en el día de la transferencia, y grupo B (n=74): ciclos transferidos en día 5 con al menos 3 embriones categoría A en día 3. Las variables analizadas son: edad materna, tasas de fecundación, embarazo clínico, implantación y embarazo evolutivo tras el 1º trimestre, % de ciclos con embriones criopreservados, tasa de embarazo clínico acumulada (ciclo en fresco más ciclo criopreservado) y tasa de embarazo evolutivo acumulada tras el 1º trimestre.

RESULTADOS:

Para las variables edad materna (33.6 vs. 34.0), tasa de fecundación en FIV (62.8 vs. 67.0) e ICSI (74.9 vs. 70.3), tasa de embarazo clínico (51.6 vs. 54.0) y tasa de implantación (33.9 vs. 39.2) no existen diferencias entre los dos grupos en estudio (grupo A vs. grupo B). La tasa de embarazo evolutivo tras el 1º trimestre está incrementada en el grupo A (45.36 vs. 39.05). El porcentaje de ciclos con embriones congelados cuando se transfiere en día 3 es mayor que cuando se dejan los embriones hasta día 5 (96.8% vs. 33.8%). Si comparamos

ambos grupos tras el ciclo en fresco y el ciclo con embriones criopreservados, tanto la tasa de embarazo clínico acumulada (64.52 vs. 54.05) como la tasa de embarazo evolutivo tras el 1º trimestre acumulada (58.27 vs. 39.05) los resultados en día 3 son mayores que los obtenidos en día 5.

CONCLUSIONES:

Con los criterios de inclusión establecidos, la transferencia embrionaria en día 3 proporciona mejores resultados que la transferencia en día 5. Se recomienda la transferencia en día 5 en situaciones concretas como: $\geq 3^\circ$ ciclo de reproducción asistida, transferencias de un único embrión y DGP.

093: EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN EXÓGENA DE FSH EN VARONES CON OLIGOZOOSPERMIA IDIOPÁTICA

F. J Oltra, M. Carracedo, P. Posadilla
FIV-LEON

INTRODUCCIÓN:

La FSH en el varón interviene tanto en la maduración de los espermatoцитos secundarios hacia espermátides como sobre las células de Sertoli, activando la producción de la proteína fijadora de andrógenos, ABP, la cual se secreta al lumen de los túbulos seminíferos y se transporta al epidídimo, contribuyendo a proporcionar la concentración de andrógenos necesaria para la maduración de los espermatozoides.

OBJETIVO:

Evaluar el efecto de la FSH exógena sobre los parámetros seminales de pacientes con oligozoospermia idiopática con niveles de FSH e Inhibina B normales.

Analizar si se puede establecer como protocolo de acción la administración de FSH exógena en pacientes con dicha patología en función de las tasas de gestación tras inseminación intrauterina (IA).

MATERIAL Y MÉTODOS:

Los criterios de inclusión en el estudio fueron tamaño, consistencia y localización testicular normal; una concentración espermática inferior a 20 millones/mL y superior a 5 millones/mL, y niveles hormonales basales normales (FSH, Inhibina B, Estradiol).

Se incluyeron en el estudio 80 pacientes, dividiéndose en 2 grupos: al grupo 1 (n=40) se le suministro FSH 150 u.i. (GONAL f 900) a días alternos durante un periodo de tres meses; al grupo 2 (n=40) no se le suministró tratamiento.

Previo al inicio del estudio, se realizaron dos seminogramas diagnósticos evaluando los distintos parámetros seminales (volumen, recuento, motilidad, morfología, viabilidad y supervivencia) para así descartar una mejora espontánea. Una vez finalizado el tratamiento se realizó un nuevo seminograma así como un ciclo de inseminación intrauterina.

RESULTADOS:

Entre ambos grupos no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros seminales. Sin embargo, en el grupo 1 hay un subgrupo de individuos (n=17, 42.5%) en los que existe una tendencia al aumento del recuento (antes del tratamiento 12.5 mil/ml, después 23.3 mil/ml). Además, al comparar las tasas de embarazo tras realizar un ciclo de IAC, se puede observar que el subgrupo que mejora presenta una tasa mayor (3/17 (17.6 %)) con respecto al grupo con tratamiento que no ha respondido (2/23 (8.6 %)) y al grupo sin tratamiento (4/40 (10 %)) respectivamente.

CONCLUSIONES:

Aunque el tratamiento con FSH en pacientes con oligozoospermia idiopática no es todo lo efectivo que quisiéramos, sí se observa un grupo de pacientes donde aumenta la concentración espermática y se mejoran los resultados en IAC, evitando el paso de estas parejas por TRAs más agresivas.

094: VARIABLES EMBRIONARIAS Y RESULTADOS DEL PROGRAMA DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES CONGELADOS.

O. Martínez-Pasarell¹, S. López¹, A. Mata¹, A. García¹, O. López¹, A. Polo², L. Bassas¹

¹Laboratorio de Seminología y Embriología, ²Servicio Ginecología, Fundació Puigvert-Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

INTRODUCCIÓN:

La congelación de embriones excedentes de los procesos de FIV y su posterior descongelación y transferencia (TEC) forman parte de la rutina del laboratorio de embriología. Sin embargo, las tasas de embarazo de los ciclos de TEC pueden ser hasta 40% inferiores a los ciclos de FIV en fresco (Hurtado de Mendoza y col. 2008). En nuestro laboratorio hemos analizado retrospectivamente los resultados obtenidos en nuestro

programa de congelación-descongelación de embriones durante un período amplio, con el fin de actualizar los criterios de selección de embriones para criopreservación y de establecer los parámetros que sirvan para la selección y transferencia de embriones congelados.

MATERIAL Y MÉTODOS:

La muestra comprende todos los procesos de descongelación de embriones desde enero de 2007 a julio

de 2008, con embriones congelados mediante congelación lenta entre enero de 2006 y diciembre de 2007. Los embriones fueron criopreservados en D+2 / D+3 de cultivo embrionario (2-10 células), con buena calidad morfológica (categorías 1 y 2). Post-descongelación, los embriones se mantenían en cultivo 24 h para valorar la reactivación de su actividad metabólica. Se analizaron los datos observados pre-congelación y post-descongelación, así como las tasas de gestación e implantación obtenidas

(Statistical Package for the Social Sciences, v15.0.1).

RESULTADOS:

Se revisaron 161 procesos de congelación/descongelación lenta (92 de D+2 y 69 de D+3), realizados a 142 parejas. La edad media de las pacientes en el ciclo de descongelación era $34,7 \pm 4,0$ años. Se descongelaron 435 embriones (252 de D+2 y 183 de D+3) y se obtuvo un 85,1% de supervivencia embrionaria global. La tasa de supervivencia celular fue del 71,1%, siendo mayor en los embriones criopreservados en D+2 versus los de D+3 (77,7% vs 62,5%; $p < 0,001$). Se observó también mayor supervivencia en los embriones con ritmo de división sincrónica respecto a los asincrónicos (75,1% vs. 65,4%; $p < 0,001$). A las 24h de cultivo post-descongelación, la tasa de crecimiento embrionario se correlacionaba negativamente con el

número inicial de células ($r: -0,126$; $p < 0,01$).

Se realizaron 152 transferencias (94,4%); 89 de D+2 y 63 de D+3. La media de embriones transferidos fue de 2,03 (rango 1-3). Se consiguieron 40 gestaciones (26,3% por transferencia; 28,2% por paciente). La probabilidad de conseguir gestación fue independiente del número de embriones transferidos. Las tasas de implantación y aborto observadas fueron del 14,6% y 20%, respectivamente. Las tasas de gestación clínica en ciclos de transferencia de embriones criopreservados en D+2 eran significativamente mejores a las de embriones de D+3 (31,4% vs. 19,0%; $p < 0,01$). Al relacionar los datos de gestación con la supervivencia y crecimiento embrionarios, se observó una correlación débilmente positiva entre la supervivencia celular y la probabilidad de implantación del embrión ($r: 0,137$; $p < 0,05$), pero no se

observó relación con el crecimiento embrionario. No se consiguió gestación evolutiva en transferencias con embriones con una supervivencia celular inferior al 50%. Tampoco con embriones de más de 9 células al criopreservar.

CONCLUSIONES:

En nuestro laboratorio deberíamos priorizar la criopreservación de embriones en D+2 con división sincrónica y evitar la criopreservación de embriones de más de 9 células en D+3. Post-descongelación, la supervivencia debe de ser el primer criterio a tener en cuenta al seleccionar embriones para transferir, además de evitar la transferencia de embriones con supervivencia inferior al 50%. La reanudación de la división embrionaria no parece ser un índice predictivo de la capacidad de implantación, por lo que el cultivo post-descongelación podría eliminarse.

095: INCIDENCIAS EN EL CARIOTIPO EN PACIENTES DE FIV

R. Lafuente, G. López, M. Sala, F. del Río, M. Gómez y M. Brassesco
CIRH-Clínica Corachan. Barcelona

INTRODUCCIÓN:

Objetivo: Evaluar la necesidad e importancia de realizar cariotipos de forma rutinaria a los pacientes que realizan tratamientos de fecundación in vitro (FIV). Determinar las diferentes anomalías detectadas, así como realizar un seguimiento de los tratamientos realizados por estos pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se tienen en cuenta, en estudio retrospectivo, pacientes que comienzan tratamiento de FIV desde el año 2006 hasta mayo de 2009.

RESULTADOS:

Se han realizado sistemáticamente cariotipos a un total de 2995 parejas

diagnosticadas para comenzar un tratamiento de FIV en nuestro centro desde el 2006 hasta mayo del 2009. Se detectan un total de 72 cariotipos correspondientes a 69 parejas con alguna anomalía en alguno de los dos miembros, lo que supone un 2,3% de las parejas atendidas en este periodo. Cabe destacar 3 parejas en las que ambos miembros presentan alguna anomalía en el cariotipo que hasta ese momento desconocían.

Las anomalías detectadas han sido: 34 translocaciones; 14 inversiones; 4 trisomías; 7 mosaicismos; 12 incrementos de la heterocromatina o regiones satélites; y 1 cromosoma Y en anillo.

CONCLUSIONES:

La importancia de algunas alteraciones

detectadas no representa un problema mayor a criterio del genetista, pero sorprende la frecuencia relativamente alta de pacientes con problemas genéticos que, en muchas ocasiones, eran desconocidos por ellos mismos.

A raíz de estos resultados, algunos de estos pacientes han recurrido a técnicas de FIV con DGP, a otros se les ha realizado FISH confirmándose la naturaleza genética de sus problemas de infertilidad y, en los casos de alteraciones más severas, han acabado realizando tratamientos con gametos donados. En definitiva, esta prueba está al alcance de cualquier centro, teniendo un coste relativamente bajo considerando la información que proporciona y, en ocasiones, puede ser determinante para un correcto diagnóstico de los pacientes.

096: DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIÓN EN PORTADORES DE TRANSLOCACIONES CROMOSÓMICAS

E. García-Mengual¹, R. Claramunt¹, A. Ruíz¹, X. Vendrell¹, M. Pérez-Alonso²

¹Unidad de Genética Reproductiva. Sistemas Genómicos S. L, Paterna (Valencia). ²Departament de Genètica. Facultat de Ciències Biològiques. Universitat de València.

INTRODUCCIÓN:

Las translocaciones cromosómicas equilibradas aparecen en un 0.2% de la población neonatal. Este porcentaje alcanza el 0.6% en el caso de parejas infértiles. Las translocaciones están relacionadas con la producción de un gran número de gametos con dotaciones cromosómicas desequilibradas que se generan tras la segregación meiótica. Por lo tanto, las parejas portadoras de translocaciones presentan un mayor riesgo de sufrir abortos espontáneos o descendencia fenotípicamente alterada. En consecuencia, estas parejas forman uno de los grupos más amplios de pacientes que se benefician del DGP.

El objetivo del presente trabajo es presentar los resultados de 51 ciclos de DGP obtenidos en nuestro laboratorio, entre octubre 2005 y abril 2009.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Previo al DGP, se llevó a cabo el estudio mediante FISH de metafases e interfases de linfocitos procedentes de sangre de los pacientes portadores de las

translocaciones. Para ello se utilizaron sondas centroméricas y/o teloméricas marcadas con diferentes fluoróforos con el fin de determinar el patrón de señales de hibridación esperado en los embriones.

La biopsia de uno o dos blastómeros por embrión se llevó a cabo mediante ácido Tyrodes o láser en día +3 de cultivo embrionario in vitro. La fijación de los blastómeros se realizó siguiendo el método de Tarkowski, y los núcleos fueron analizados mediante FISH utilizando la combinación específica de sondas de ADN comerciales para cada caso. La transferencia de los embriones normales/equilibrados al útero materno se realizó en los días 4 ó 5 de cultivo in vitro.

RESULTADOS:

Un total de 37 parejas se sometieron a 51 ciclos de DGP, de las cuales 23 eran portadoras de translocaciones recíprocas y 14 lo eran de translocaciones robertsonianas. Se analizaron individualmente 392 blastómeros de los cuales 339 fueron diagnosticados (86.5%), que corresponden al 92.7% de los

embriones analizados (301). De los 279 embriones diagnosticados 88 (31.5%) resultaron ser normales o equilibrados para la translocación estudiada. En el 68.6% (35/51) de los casos se realizó la transferencia al útero de embriones normales o equilibrados para la translocación analizada. En el 31.4% restante no se dispuso de embriones aptos para la transferencia debido a su estatus genético o a criterios embriológicos. Finalmente un 20% (7/35) de las pacientes obtuvo un embarazo, de las cuales 5 (14.3%) llegaron a término con el nacimiento de niños fenotípicamente normales.

CONCLUSIONES:

El DGP ofrece la posibilidad de seleccionar en estos casos embriones normales o equilibrados permitiendo reducir así la elevada tasa de abortos espontáneos que caracteriza a este grupo de pacientes y aumentar las posibilidades de embarazos viables. En muchos casos el factor limitante es, entre otros, encontrar embriones normales o equilibrados aptos para transferir.

097: FLUJO REPRODUCTIVO: ESTUDIO DE LAS MOTIVACIONES Y CARACTERÍSTICAS DE LAS PACIENTES EXTRANJERAS DEL INSTITUT UNIVERSITARI DEXEUS

O. Oliana¹, L. Echeverría¹, M. Boada¹, B. Coroleu¹, A. Veiga^{1,2}, P. Nolas Barri¹

¹Departament d'Obstetrícia, Ginecologia i Reproducció USP Institut Universitari Dexeus. Barcelona. ² Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMRB). Barcelona.

INTRODUCCIÓN:

En los últimos años se ha observado un aumento de parejas extranjeras que se desplazan a nuestro país para recibir tratamientos de fertilidad. La legislación que regula las técnicas de reproducción humana asistida es muy variable entre

los distintos países europeos. La proximidad de los países con legislaciones más permisivas así como la facilidad actual de desplazamiento entre ellos ha propiciado este aumento que popularmente se conoce como "turismo reproductivo". Este hecho, junto con el carácter progresista de la legislación

española sobre TRA ha generado un gran flujo de pacientes internacionales hacia nuestro país. En muchos casos el flujo hacia otros países ha constituido la única solución para que los pacientes puedan llevar a cabo el tratamiento necesario.

OBJETIVO:

En el presente estudio se analizan las características de las pacientes recibidas en el Institut Universitari Dexeus por el periodo de un mes.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Durante todo el mes de noviembre del 2008 y a través del servicio de atención al paciente internacional del centro, se distribuyó entre todas las pacientes extranjeras un cuestionario anónimo con preguntas de tipo personal y médico elaborado por la Task Force on Ethics and Law y que forma parte del estudio multicentrico Cross-border reproductive care de la ESHRE.

RESULTADOS:

Los resultados de los 72 cuestionarios contestados ponen de manifiesto que el perfil de las pacientes recibidas era heterosexual, con estudios universitarios y de una media de edad de 39 años,

superior a la media de edad (36.5 años) del programa de FIV del centro.

El 91.7% de las parejas eran de origen italiano, casadas o viviendo en pareja. El 20.7% de las pacientes manifestaron haber realizado anteriormente ciclos de FIV sin resultados satisfactorios. Por lo que al tratamiento se refiere, se desplazaron mayoritariamente para ciclos de FIV/ICSI y donación de gametos y embriones (54.2% y 37.5% de las pacientes respectivamente). La elección del centro fue por recomendación médica (47.2%) o por consejo de amigos y familiares (36.1%) principalmente.

En cuanto al motivo principal del desplazamiento, las respuestas de las pacientes manifestaron un problema de tipo legal (43.8%) y en segundo lugar la búsqueda de una mejor calidad en el tratamiento (26.9%).

CONCLUSIONES:

Las características de las pacientes que se

desplazan a nuestro centro desde el extranjero son de mayor edad que la media de nuestras pacientes del programa de FIV y con una formación académica superior, lo que denota una posición socio-económica media-alta que permite afrontar el elevado coste de estos ciclos (tratamiento+desplazamiento).

Por lo que se refiere a la motivación, los aspectos legales son la principal causa de desplazamiento de las parejas lo que apunta a que la promulgación de leyes restrictivas no impide la realización de los tratamientos sino que promueven el desplazamiento de determinadas parejas a otros países.

La gran dimensión que ha adquirido este fenómeno en los últimos tiempos aconseja una reflexión y análisis de los datos globales y las condiciones en las que se realiza para poder adaptarlos a las necesidades específicas de estos pacientes y, sobretodo garantizar la calidad y la seguridad de los tratamientos.

098: RELACIÓN ENTRE LAS TASAS DE CRECIMIENTO DEL EMBRIÓN EN FASES TEMPRANAS DE DESARROLLO Y SU DIFERENCIACIÓN SEXUAL

C. Álvarez, R. Taronger, C. García, M. Sánchez, G. González de Merlo
Unidad de Reproducción. Hospital General Universitario, Albacete.

INTRODUCCIÓN:

Durante el los tratamientos de fecundación in vitro (FIV) la selección de los embriones para transferir está a menudo basada en criterios morfológicos y en la velocidad de división. En algunas especies de mamíferos se ha demostrado mayor velocidad de desarrollo y división en los embriones masculinos que femeninos (1). En humanos hay diversidad de opiniones, aunque la mayoría de los autores defienden que la transferencia de blastocistos parece estar asociada con un incremento en el nacimiento de niños (2). El objetivo de este trabajo fue determinar la posible relación entre las tasas de crecimiento embrionario en fases tempranas de desarrollo ($\leq 8-10$ células) y su diferenciación sexual.

MATERIAL Y METODOS:

Se realizó un estudio retrospectivo en el que se analizaron 205 transferencias embrionarias (TE) que finalizaron con el nacimiento de un niño, transfiriéndose un total de 458 embriones que dieron lugar a 264 niños (: 135, : 129). Se estudió la relación de la tasa de división embrionaria con el sexo de los recién nacidos (RN).

Los embriones se dividieron en tres grupos según el número de blastómeros que tenían en el momento de la transferencia: ≤ 3 , 4 y ≥ 5 blastómeros. Sólo se consideraron las transferencias en las que se transfirió un solo tipo de embriones para poder valorar el sexo de los niños nacidos en función del número

de blastómeros de los embriones transferidos.

Se comparó entre los grupos, el sexo y el peso de los RN. Los embriones se cultivaron en G1 hasta su transferencia en EmbryoGlue. La significación de las diferencias se estimó utilizando el test de t-Student y el análisis de c^2 . Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para $p < 0,05$.

RESULTADOS:

De las 205 TE (edad media: $34,0 \pm 3,5$ años), se transfirieron exclusivamente embriones con ≤ 3 blastómeros en 18 TE, con $= 4$ en 116 y con ≥ 5 en 71. Tras la transferencia de embriones con ≤ 3

blastómeros nacieron: 11 niños (peso medio: 2911,4±451,4 g) y 12 niñas (peso: 2792,2±630,4 g); de embriones con 4 blastómeros: 71 niños (2693,0±717,8 g) y 78 niñas (2574,2±758,9 g) y de embriones ≥ 5: 46 niños (2789,9±694,6 g) y 46 niñas (2724,7±630,5 g). Al comparar el número de niñas y niños nacidos según el número de blastómeros de los embriones transferidos no se

observaron diferencias significativas. El peso medio de los niños y niñas nacidos en cada uno de los grupos tampoco mostró diferencias significativas.

CONCLUSIONES:

La tasa de crecimiento de los embriones en fases de desarrollo más temprano (≤ 8-10 células) no determina ni el sexo ni el peso del RN.

REFERENCIAS:

1. Avery B, Madison V, Greve T. Sex and development in bovine in vitro-fertilized embryos. *Theriogenology* 1991; 35: 953-63.

2. Luna M, Duke M, Copperman A, Grunfeld L, Sandler B, Barritt J. Blastocyst embryo transfer is associated with a sex-ratio imbalance in favour of male offspring. *Fertil Steril* 2007; 87: 519-23.

099: CLASIFICACIÓN EMBRIONARIA DE ASEBIR, EXPERIENCIA DESDE EL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO

R. Bonet, C. Vives, P. Feliu, T. Planella, F. Vidal, I. Saumell

Embriogyn Centre de Reproducció Assistida i Diagnòstic Prenatal, Tarragona

INTRODUCCIÓN:

Estudio comparativo entre los criterios de valoración embrionaria de ASEBIR y los criterios utilizados en el laboratorio de Fecundación in vitro (FIV) de la Clínica de Reproducción Asistida Embriogyn. Los objetivos de este estudio son, en primer lugar, comparar los dos métodos de valoración embrionaria de Embriogyn y ASEBIR. Y en segundo lugar, ver si existe una tendencia lineal creciente significativa en la tasa de implantación de las diferentes categorías embrionarias propuestas por ASEBIR utilizando la prueba chi-cuadrado de tendencia lineal (X2TL) de Mantel-Haenzel.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Los datos analizados corresponden a 683 embriones procedentes de 106 ciclos tanto FIV Convencional como de ICSI, con gametos propios o de donante, y con transferencia embrionaria realizada a día+2 o día+3, realizados en Embriogyn durante el año 2008. Los embriones se han revalorado asignándoles la categoría que les correspondería según los criterios de clasificación de ASEBIR. Se ha analizado si existe concordancia entre el destino que le dio Embriogyn a cada embrión (transferido/congelado /descartado) y

el destino que tendrían aplicando la clasificación de ASEBIR. A los embriones que presentan dicha concordancia se les ha asignado un nº 1, y por tanto, un nº 0 a los que no concuerdan.

RESULTADOS: La comparativa muestra un 92,83% de similitud entre los dos criterios de valoración embrionaria. Del total de embriones transferidos (n=261), un 72,63% corresponden a la categoría A de ASEBIR. Del total de embriones congelados (n=117) un 22,53% son de categoría A. Respecto a los embriones descartados (n=305), un 79,94% corresponden a la categoría D. Por otra parte, la prueba estadística chi-cuadrado de tendencia lineal (X2TL) de Mantel-Haenzel, muestra una X2TL=11,27 con un grado de libertad (p<0.001).

CONCLUSIONES:

Hay ciclos en los que se encuentran discrepancias (7,17%) en la decisión de cuales son los mejores embriones para transferir, congelar, o los que se descartan. El 55% de las discrepancias corresponden a ciclos en que después de transferir los embriones de mejor calidad sólo queda un posible embrión para congelar, si éste no es de óptima calidad, en Embriogyn, se deja en cultivo, y únicamente en el caso de que

llegue a desarrollar un blastocisto se congela. Los principales aspectos morfológicos que han generado discrepancias (28,5%) entre las dos clasificaciones, es la valoración de la morfología citoplasmática y nuclear. Estos parámetros morfológicos son: el "pitting", la compactación a día+3, la presencia de retículo endoplasmático liso (REL), citoplasma granular (CG) o granulosidad central (GC), distribución y número de vacuolas y el grado de multinucleación. Otro parámetro que ha generado un 16,5% de las discrepancias, es que la clasificación ASEBIR no contempla la posibilidad de ascender de categoría a día+3, a los embriones penalizados a día+2. Por otro lado, después de calcular las tasas de implantación de cada categoría de ASEBIR y realizar-se la prueba estadística X2TL de Mantel-Haenzel, se ha visto que sí existe una tendencia lineal creciente estadísticamente significativa en la tasa de implantación a medida que mejora la categoría embrionaria de ASEBIR. Entendemos, pues, que la clasificación de ASEBIR sí permite seleccionar cualitativamente los embriones y, por tanto, ceñirse a ésta puede pronosticar la capacidad de gestación de cada embrión.

100: PRIMEROS RESULTADOS EN LA VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS CON SISTEMA CERRADO. NUESTRA EXPERIENCIA EN CIRH.

F. del Río, O. Cairó, A. Brassesco, S. Rovira, M. Rodríguez, L. Prats, M. Brassesco
Centro de Infertilidad y Reproducción Humana (CIRH)

INTRODUCCIÓN:

En el Centro de Infertilidad y Reproducción Humana (CIRH) vitrificamos embriones de manera rutinaria desde finales de 2007, así que nos propusimos poner a punto esta técnica para criopreservar ovocitos humanos. Comenzamos a vitrificar ovocitos en abril de 2008, utilizando medios comerciales de Irving Scientific® y Cryotip® como soporte. Los ovocitos incluidos en este estudio provienen de donantes.

OBJETIVO:

Mostrar los resultados obtenidos en la vitrificación de ovocitos utilizando un soporte cerrado, como es el Cryotip®.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se incluyen 11 donantes cuyos ovocitos fueron destinados a 11 receptoras durante el año 2009. Parte de los ovocitos de la receptora fueron vitrificados y desvitrificados el mismo día de la punción folicular, mientras el resto se inseminaron en fresco.

Se utiliza un protocolo con antagonistas

de la GnRH, estimulando a las donantes con FSH urinaria e induciendo la maduración ovocitaria con agonistas de la GnRH. Dos horas después de la punción folicular se procede a decumular los ovocitos recuperados y a revisar el grado de madurez. Tan sólo aquellos ovocitos metafase II y con buen aspecto serán vitrificados. Al menos 45 minutos después de la denudación, los ovocitos son vitrificados siguiendo el protocolo de la casa comercial. Tras mantenerlos en nitrógeno líquido para su correcta conservación se procede a realizar la desvitrificación, siguiendo igualmente el protocolo de la casa comercial. Dos horas después se procede a realizar la microinyección. La morfología ovocitaria se valora tanto tras la decumulación, como después de la desvitrificación y en el momento de la ICSI.

RESULTADOS:

Hasta el momento (mayo de 2009) se han desvitrificado 58 ovocitos, 45 de los cuales resistieron el proceso (77.58%), siendo todos ellos microinyectados. De éstos, 33 ovocitos fecundaron correctamente (73.33%) y se obtuvieron 28 embriones, 25 de los cuales fueron evolutivos. Estos datos son muy

similares a los obtenidos en el Laboratorio de FIV habitualmente (78.73% de fecundación por ICSI y 97% de división en 2009).

Se han realizado cuatro transferencias en las que todos los embriones provienen de ovocitos vitrificados, quedando dos pacientes embarazadas y una tercera está pendiente de resultado. Además, se han realizado tres transferencias mixtas, en las que un embrión proviene de ovocitos vitrificados y el otro de un ovocito no vitrificado, quedando embarazada una paciente.

Todos los embriones sobrantes de buena calidad fueron vitrificados.

CONCLUSIONES:

Aunque el número de casos es pequeño, la utilización de un sistema cerrado como el Cryotip no compromete las tasas de supervivencia y desarrollo de los ovocitos y de los futuros embriones. Además, se elimina el riesgo potencial de contaminaciones cruzadas durante su almacenamiento en nitrógeno líquido.

101: INTERPRETACIÓN DE TESTS DIAGNÓSTICOS DE INFERTILIDAD MASCULINA: POOLED ANÁLISIS DE SPERM CHROMATIN STRUCTURE ASSAY (SCSA) Y PARÁMETROS CLÁSICOS DE SEMEN (CSP)

S. Zamora, M. A. Calderón, M. C. Gonzalvo, A. Fernández, B. Rabelo, J. Fontes, R. Ruiz de Assin, B. Romero.
U. Reproducción H. U. Hospital Virgen de las Nieves, Granada

INTRODUCCIÓN:

El presente estudio está basado en una búsqueda sistemática en PubMed y compara la validez clínica de los parámetros clásicos de semen (CSP) con la evaluación de la estructura de la

cromatina espermática (SCSA) en diferentes contextos clínicos. El objetivo de este estudio es evaluar la validez clínica del SCSA frente a CSP.

MATERIAL Y MÉTODOS:

La base de datos de PubMed fue revisada utilizando palabras clave (test diagnóstico, semen, espermatozoide, embarazo) en tres escenarios clínicos: parejas que buscan embarazo; parejas que han estado buscando durante 12 meses sin resultado; y parejas tratadas

con inseminación intrauterina. Existía una alta heterogeneidad entre los estudios incluidos.

RESULTADOS:

Para parejas que buscan concebir con un resultado anormal del SCSA, la probabilidad de factor masculino varía de un valor pre-test de 7,5% a un valor post-test de 32,1% (CI 15.7-54.5) cuando se obtiene un resultado anormal de SCSA, mientras que tras un resultado anormal en

los CSP la probabilidad post-test es de 17,3% (CI 11.8-24.5). Para parejas que han estado buscando durante 12 meses sin resultado la prevalencia pre-test de infertilidad por factor masculino es del 50%, y la probabilidad post-test de infertilidad de factor masculino después de un resultado anormal del test es muy similar para SCSA y CSP (79,75%; CI: 41,5-95,6 vs. 79,67%; CI: 75-83,7). En parejas tratadas con inseminación intrauterina aunque la validez clínica del SCSA es mayor que la de la morfología espermática

sola (97,2%; CI: 93,6-98,8 vs. 91,2%; CI: 86,6-94,5) no parece suficiente para indicar la inclusión de esta técnica en el estado del varón infértil.

CONCLUSIONES:

No existe evidencia clínica para recomendar el uso del SCSA en el diagnóstico de esterilidad de causa masculina. Su validez clínica no es mayor que la de los parámetros clásicos de semen.

102: PRIMER NACIMIENTO EN GINEMED TRAS SUPER-ICSI

B. Migueles, M. Dorado, M. Hebles, M. González, L. Aguilera, P. Sánchez, F. Sánchez.
Clínicas Ginemed, Sevilla

INTRODUCCIÓN:

La combinación del diagnóstico de Fragmentación del DNA en el espermatozoide con la aparición de microscopios más potentes que los que actualmente tenemos en los laboratorios de Reproducción Asistida nos ha permitido obtener embarazos en casos en los que con una FIV-ICSI clásica no lo hubiésemos conseguido. Un semen con la fragmentación del DNA alterada nos da la misma tasa de fecundación, misma calidad embrionaria y misma tasa de división embrionaria hasta día +2, por lo que si el fallo de FIV se debe a este tipo de patología, ninguno de los parámetros anteriores nos va a dar información al respecto.

La incorporación de ambas técnicas en nuestro laboratorio (tras la adquisición del microscopio Leyca AM6000 en Mayo de 2008) nos ha permitido el tratamiento de esta Fragmentación Alterada del DNA del espermatozoide mediante su selección con alta magnificación.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Paciente de 30 años que viene a consulta de esterilidad tras fallo de FIV en otro centro. Vienen diagnosticados como: síndrome de ovario poliquístico y asteno leve y terato severa (presentando el

seminograma un recuento de 31x106 y una motilidad tipo A de 16%). Se realiza un primer ciclo en nuestro centro en el que se obtiene una buena respuesta ovárica, con un buen número de embriones y una buena transferencia con embriones tipo A (según la clasificación de ASEBIR); no queda embarazada. Se realizan dos transferencias posteriores con los embriones vitrificados sobraron de este primer ciclo en las que tampoco se obtuvo un resultado positivo. Antes de realizar un segundo ciclo indicamos al paciente la realización de un Test de Fragmentación del DNA en el que obtenemos un resultado de un 45% de fragmentación en la muestra en fresco. Se realiza un segundo ciclo con idéntica estimulación y similar número de ovocitos MII que se microinyectan con espermatozoides seleccionados a 6000 aumentos debido a la fragmentación diagnosticada.

del segundo ciclo de microinyección realizada con alta magnificación. La calidad de los embriones no fue diferente a las transferencias anteriormente realizadas. El resultado de la β-hCG a los 12 días post-transferencia fue de 148 UI. La paciente dio a luz en Abril a las 39 semanas de embarazo; el bebé pesó 3.400gr y se encuentra en perfecto estado de salud.

CONCLUSIONES:

El uso de SUPER-ICSI para intentar mejorar las tasas de embarazo en aquellos casos que presentan un factor masculino severo nos está ofreciendo resultados que con la microscopía convencional usada hasta ahora no nos habría sido posible solucionar.

BIBLIOGRAFÍA:

1.The morphological normalcy of the sperm

CICLOS	OVULOS MADUROS/OVULOS TOTALES	TASA FECUNDACION	EMBRIONES TRANSFER En día 1 3	TRANSFER VITRIFICADOS (primer ciclo)
1º CICLO	62.06% (18/29)	77.7%(14/18)	8 cels tipo A 8cels tipo A 8 cels tipo A	8cels tipo A 4cels tipo A Compacto 4cels tipo A Compacto 4cels tipo A
2º CICLO	66.6%(14/21)	78.5%(11/14)	8 cels tipo A 8cels tipo A 8 cels tipo A	

RESULTADOS:

Obtuvimos embarazo tras la realización

nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. Arie

Berkovitz, Fina Eltes, Sholomit Yaari, Nathan Katz, Ilya Barr, Ami Fishman, Benjamin Bartoov. Human Reproduction. Vol 20 N°1, pp185-190, 2005

2. Does the presence of nuclear vacuoles in

human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome?. Arie Berkovitz, Fina Eltes, Adrian Ellenbogen, Sigal Peer, Dov Feldberg, Benjamin Bartov. Human Reproduction Advance Access published February 23, 2006

3. Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. Pierre Vanderzwalmen, Antje Hierner, Paul Rubner, Magnus Bach, Anton Neyer.

103: PRONÓSTICO DE LOS CICLOS DE CRIOTRANSFERENCIA EN FUNCIÓN DEL RESULTADO DEL CICLO EN FRESCO

A. Rodríguez-Arnedo, J. Ten, J. Guerrero, M. A. Carracedo, R. Bernabeu.
Instituto Bernabeu, Alicante

INTRODUCCIÓN:

El objetivo de los ciclos de reproducción asistida es conseguir un embarazo a término. En muchas ocasiones este resultado no ocurre tras la transferencia de embriones en fresco y es necesario recurrir a embriones congelados en ciclos previos. La incertidumbre que produce el realizar un nuevo ciclo con embriones de la misma cohorte nos lleva al objetivo principal de este trabajo, evaluar el pronóstico de un ciclo de criotransferencia (CT) tras la realización de un ciclo fallido con transferencia embrionaria (TE) en fresco, tanto en ciclos FIV/ICSI como en donación de ovocitos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se llevaron a cabo dos grupos: A (n=79): pacientes que habían realizado un primer ciclo de FIV/ICSI con TE, bien con resultado de β -HCG negativa (n=54), o con resultado de aborto bioquímico o de primer trimestre (n=25), realizando un ciclo posterior de criotransferencia, y grupo B (n=109): pacientes que habían realizado un primer ciclo de donación de ovocitos con TE y resultado de β -HCG negativa (n=73), o con resultado de aborto bioquímico o de primer

trimestre (n=36) y posterior ciclo de criotransferencia. Para cada uno de los grupos se analizó el porcentaje de ciclos con transferencia, la tasa de embarazo clínico, aborto bioquímico y de primer trimestre. Se analizaron los datos con el paquete estadístico SPSS.

RESULTADOS:

Se comprobó que tanto el número de embriones desvitrificados, como el número de embriones que sobrevivieron al proceso y el número de embriones transferidos en ambos grupos (FIV/ICSI y receptoras) presentaron los mismos resultados.

En el grupo de pacientes de FIV/ICSI con abortos en los ciclos previos en fresco, se observó un incremento en la tasa de embarazo clínico, así como un aumento del aborto de primer trimestre, siendo la tasa de aborto global superior a la de los ciclos de FIV/ICSI con resultado de β -HCG negativa en el ciclo en fresco. No obstante, ninguno de estos resultados fue estadísticamente significativo.

En el grupo de los pacientes de donación de ovocitos se observó un efecto similar en cuanto a la tasa de abortos del primer

trimestre, produciéndose un incremento significativo de éstos en los ciclos de CT que provenían de ciclos en fresco con abortos, respecto a los provenientes de β -HCG negativa (p=0.020). Sin embargo, y a diferencia del grupo de FIV/ICSI, también observamos un descenso en la tasa de embarazo clínico (p= 0.062) tras comparar estos mismos grupos.

CONCLUSIONES:

Existe una tendencia al aumento de las posibilidades de éxito tras CT cuando el ciclo de FIV/ICSI en fresco ha tenido como resultado implantación embrionaria aunque se haya producido un aborto, bien sea bioquímico o clínico. En cuanto a los ciclos de CT tras donación de ovocitos, se observa un mejor pronóstico en el caso de que el ciclo en fresco haya tenido como resultado β -HCG negativa. Esto podría ser debido al aumento en la tasa de aborto del primer trimestre cuando se producen abortos previos en fresco, sugiriendo que existen otros factores que influyen en la evolución favorable del embarazo y que no están relacionados directamente con el embrión.

El análisis de un número de casos mayor nos permitirá validar estos resultados.

104: ¿MERECE LA PENA REALIZAR UN CICLO CON 1 SOLO OVOCITO

J. A. Gragera, M. C. Cañadas, C. Urda, V. Badajoz, S. Camacho, M. De La Casa, A. R. Díaz, I. Lozano, L. Martínez, J. Gijón, M. Alcaraz, R. Bonache, J. Rodríguez, C. Pérez, A. Martínez de Arenaza.
GINEFIV, Madrid

INTRODUCCIÓN:

El factor etario junto a una FSH elevada son algunas de las limitaciones que

presentan no pocas mujeres en un ciclo. Si además se añade un factor masculino, las posibilidades de que haya un pobre resultado son muy elevadas. En los

pocos casos en los que sólo se recupera 1 ovocito tras la punción, se podría plantear la duda de si merece la pena seguir adelante con el proceso.

Con este estudio intentaremos determinar la rentabilidad de dichos ciclos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Análisis retrospectivo sobre los ciclos realizados en Ginefiv, entre enero 2006 y diciembre 2008, con resultado de 1 ovocito/punción.

Se descartaron los ovocitos atrésicos, pero sí se contabilizaron los que estaban inmaduros. Se utilizó el protocolo de ASEBIR en la clasificación embrionaria¹.

RESULTADOS:

Se analizaron 97 ciclos de 96 pacientes (1 paciente realizó 2 ciclos con un único ovocito) con edad media $37,86 \pm 4,26$ años y FSH $9,73 \pm 4,88$ (UI/l); la media de folículos puncionables (FP) fue de $3,94 \pm 4,61$ y sólo el 18,56% (18) tenían 1 FP en el último control pre-punción. Se programaron 87 ciclos con microinyección espermática (ICSI), y 10 con fecundación "in Vitro" convencional (FIV); pero en 21 de los ciclos de ICSI se observó que el ovocito estaba inmaduro (15 en M-I y 6 en P-I). Sólo 7 evolucionaron en incubación, por lo que se realizaron 73 microinyecciones (68 ICSI y 5 TESE+ICSI).

La muestra de semen procedía de la pareja en un 93,98% de los casos (78) y fue de donante en 5 ciclos (6,02%). El semen era criopreservado en 14 casos (16,87%) y fresco en 69 (83,13%).

Para la mayoría de las pacientes suponía su primer ciclo: 56,7% (55).

Los resultados se presentan en las siguientes tablas:

deberían decidir si merece la pena seguir adelante con el ciclo al recuperar un único ovocito tras la punción.

	CICLOS	NO	LEVE	SEVERO	MUY SEVERO
N	83	9	39	20	15
%	-	10,84	46,99	24,1	18,07

Tabla 1: Factor masculino

	CICLOS	INMADUROS	INSEMINADOS	NO FECUND	2 PN, 2 CP	3 PN
N	97	14	83	37	42	4
%	-	14,43	85,57	44,58	50,6	4,82

Tabla 2: Inseminación

	NO FECUND	LISADO S	1 PN	2 CP	1 CP	INMAD (FIV)
N	37	6	1	16	12	2
%	-	16,22	2,7	43,24	32,43	5,41

Tabla 3: Causas de no fecundación.

	2 PN, 2 CP	NO VIABLES	TRF	CAL 1	CAL 2	CAL 3	CAL 4
N	42	2	40	6	18	16	0
%	-	4,76	95,24	15	45	40	0

Tabla 4: Transferencias

	CICLO S	INSEM	TRF	β-HCG	ABORTOS	Λ TERMINO
N	97	83	40	7	1	6
%	-	85,57	48,19	17,5	14,29	85,71
% POR CICLO	-	-	41,24	7,22	1,03	6,19

Tabla 5: Embarazos

CONCLUSIÓN:

Aunque según la bibliografía² con un único ovocito maduro es aconsejable la realización de ICSI, según nuestros datos, pese al tamaño de la muestra, no hay diferencia significativa entre microinyección y FIV convencional (52%-40% p: 0,47) pero no es apropiada la inyección de ovocitos madurados "in Vitro" (0% fecundación).

Por otro lado, hasta el 6,19% (6) de estos ciclos evolucionó en embarazo a término, por lo que deberían ser las parejas, clara y exhaustivamente informadas de sus posibilidades, las que

BIBLIOGRAFÍA:

- 1.- Cuadernos de Embriología Clínica. ASEBIR. II.- Criterios de Valoración Morfológicos de Oocitos, Embriones tempranos y Blastocistos Humanos. Comisión de Trabajo ASEBIR. Coordinadores: M. Ardoy y G. Calderón. Madrid. 2007.
- 2.- Comparing intracytoplasmic sperm injection and in Vitro fertilization in patients with single oocyte retrieval. Gozlan I et al. Fertil Steril. 2007 Mar; 87(3):515-8.

105: ESTUDIO COMPARATIVO DE TRANSFERENCIAS EN DÍA +3 FRENTE A DÍA +5 EN CASOS SELECCIONADOS

M. Hebles, M. Dorado, B. Migueles, M. González, L. Aguilera, J. Lara, A. Rodríguez, F. Sánchez, P. Sánchez. Clínicas Ginemed, Sevilla

INTRODUCCION:

El éxito de los programas de Reproducción Asistida es conseguir gestación reduciendo el número de gestaciones múltiples.

La práctica habitual es la transferencia en día 2 ó 3 de cultivo. Para aumentar la tasa de implantación, se tiende a aumentar el número de embriones transferidos en edades medias.

El cultivo hasta blastocisto proporciona

una selección embrionaria, reduciendo el número de embriones a transferir, consiguiendo disminuir el número de embarazos múltiples.

Realizamos estudio prospectivo para determinar si las transferencias en día 3

ó 5 tienen diferencia significativa en las tasas de implantación, estudiando al mismo tiempo qué factores afectan.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se realiza estudio prospectivo a 114 parejas que acudieron a la Clínica Ginemed para realizar un ciclo de Fecundación in Vitro entre septiembre de 2008 y abril de 2009.

Los pacientes fueron randomizados en dos grupos según se realizara la transferencia en día 3 o 5 de cultivo:

Grupo Estudio: incluye un total de 60 pacientes en los que se realizó la transferencia en día 5 de desarrollo.

Grupo Control: incluye un total de 54 pacientes que fueron transferidos en día 3 de desarrollo.

Los embriones fueron cultivados en Fertilization medium (SAGE) y Cleavage Medium (SAGE) hasta el día 3 de desarrollo. El día 3 son cambiados a Blastocyst medium (SAGE) hasta el día de la transferencia.

La transferencia embrionaria, tanto en día 3 como en día 5 se realizó utilizando

Blastocyst medium (SAGE) suplementado.

El número de blastómeras, simetría y grado de fragmentación fueron evaluados diariamente.

Los criterios de inclusión en este estudio fue la existencia de 5 o más embriones con al menos 7 u 8 células en día 3 de desarrollo y una fragmentación < del 20%.

Los blastocistos fueron graduados de acuerdo al sistema de Gardner and Schoolcraft, según el grado de expansión.

El análisis estadístico revela la no existencia de diferencia significativa en la edad de las pacientes (33.30 vs 33.46), el protocolo de estimulación y el grosor endometrial entre ambos grupos.

RESULTADOS:

En la Tabla 1 observamos que aplicando la prueba de Mann-Whitney observamos

	Grupo control	Grupo estudio	p
N	54	60	NS
Tasa de Gestación	(28/54)51.8%	(46/60)76.7%	< 0.001

diferencia significativa en la tasa de gestación entre ambos grupos:

Aplicando la prueba de Kruskal-Wallis no observamos diferencia en relación al protocolo utilizado (p=0.25) ni respecto al grosor endometrial (p=0.28) entre ambos grupos.

CONCLUSIONES:

El cultivo largo al estadio de blastocisto puede ser una herramienta útil en los programas de Reproducción Asistida para disminuir el número de embriones a transferir sin bajar por ello la tasa de implantación.

Con los resultados mostrados en nuestro estudio, el grupo de pacientes transferidos en estadio de blastocisto presenta mayor tasa de implantación que el grupo con transferencia en día +3.

106: RELACIÓN ENTRE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS Y PARÁMETROS SEMINALES EN PACIENTES DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

J. R. Ortiz de Galisteo, L. Subías*, N. Toledo, V. Gallego, M. Á. Fajardo, I. S. Álvarez. Instituto Extremeño de Reproducción Asistida (IERA). Badajoz. * Laboratorio de Análisis Luis Subías. Villafranca de los Barros.

INTRODUCCIÓN:

Aunque se ha intentado correlacionar patologías seminales con distintos problemas de salud y hábitos sociales como el consumo de alcohol y tabaco o con factores ambientales como la contaminación o el manejo de pesticidas, no existen prácticamente estudios que analicen una posible relación entre los parámetros bioquímicos rutinarios de un análisis sanguíneo y los valores del seminograma para un mismo paciente.

En este trabajo nos hemos propuesto analizar la posible correlación entre 10 parámetros obtenidos del suero sanguíneo de pacientes de reproducción asistida con cuatro de los parámetros básicos de un seminograma (volumen, concentración, movilidad y REM).

MATERIAL Y MÉTODOS:

Para este estudio se utilizaron 100 pacientes de reproducción asistida que acudieron al centro IERA entre los años 2008 y 2009 y que fueron informados del

proyecto. Las muestras de semen se obtuvieron por masturbación en el centro y se analizaron en el laboratorio parámetros macro y microscópicos antes de una hora. También se les realizó una extracción de sangre (siempre a la misma hora) que posteriormente se centrifugó a 700 G durante 10 min y la fracción sérica se mantuvo refrigerada hasta el momento de su análisis bioquímico, siempre antes de 1 semana. Para el análisis de los parámetros bioquímicos se utilizó un robot automatizado (RAL) siguiendo las

instrucciones del fabricante. El análisis estadístico se llevo a cabo mediante estimaciones MCO (Mínimos Cuadrados Ordinarios) utilizando un software específico (GretL).

RESULTADOS:

En un primer abordaje de los datos obtenidos, no hay una relación directa entre la mayoría de los parámetros bioquímicos analizados y la calidad del semen en los pacientes. Sin embargo, existe una regresión lineal estadísticamente significativa ($p < 0.01$) entre volumen y glucosa de forma que a medida que se incrementa la concentración de glucosa disminuye el volumen de eyaculado.

Otros dos indicadores presentan un cierto grado de correlación con parámetros seminales aunque con menor significación ($p < 0.05$); la creatinina tiene una correspondencia negativa con el volumen y movilidad progresiva (a+b), es decir, a mayor concentración de creatinina, menor volumen y movilidad; la aspartato aminotransferasa la presenta positiva, aumentando la concentración de espermatozoides por ml según se incrementa la concentración de esta enzima. Curiosamente, no hemos encontrado relación entre ninguno de los valores bioquímicos y el REM.

CONCLUSIONES:

En este trabajo se presentan datos preliminares que parecen indicar una relación entre algunos parámetros bioquímicos y la calidad del semen. En concreto, un aumento de glucosa podría suponer una disminución en el volumen, mientras que la creatinina influye también en éste y en la movilidad. Por otra parte, la presencia de algunas enzimas puede influir en la concentración espermática, como ocurre con algunas transaminasas. En cualquier caso, se necesitan más estudios para establecer una relación clara entre la bioquímica sanguínea y los valores del seminograma.

107: TASA DE GESTACIÓN DE INSEMINACIONES ARTIFICIALES EN FUNCIÓN DEL RECUENTO DE ESPERMATOZOIDES MÓVILES PROGRESIVOS. IVI-VIGO

D. Pabón, N. Torres, M. Martínez, S. Portela, E. Muñoz.
IVI, Vigo

INTRODUCCIÓN:

En tratamientos de Inseminación Artificial generalmente se considera como condición para su realización, la recuperación mínima de 3 millones de espermatozoides móviles progresivos, sin embargo hay casos en los que el día de la inseminación intrauterina se obtiene menos del Recuento de Espermatozoides Móviles Progresivos (REM) del estimado previamente en el diagnóstico.

OBJETIVO:

Nuestro objetivo es comparar en los tratamientos de Inseminaciones artificiales intrauterinas, los resultados clínicos obtenidos de tasa de gestación en función del Recuento de Espermatozoides Móviles Progresivos conseguidos.

MATERIALES Y MÉTODOS:

En nuestro trabajo presentamos un análisis retrospectivo en el que se incluyen 300 ciclos de Inseminaciones intrauterinas, realizadas en la clínica IVI-VIGO durante el 1 de enero de 2006 hasta 31 diciembre de 2008.

RESULTADOS:

se incluyen 300 ciclos de IA con una tasa total de gestación del 24.3%. La tasa de embarazo en ciclos donde se han transferido entre 1 y < 3 millones de espermatozoides es del 19,04%, la tasa gestacional cuando se transfieren

entre 3 millones y < 8 millones, de de 30,08% y cuando se transfieren >8 millones de espermatozoides móviles es de 20,51.

CONCLUSIONES:

nuestros resultados indican que incluso cuando se transfieren menos de 3 millones de espermatozoide móviles progresivos, obtenemos una buena tasa de gestación, lo que nos hace concluir que no se aconseja abortar la realización de una inseminación artificial si se obtienen menos del REM recomendado a la hora de la inseminación.

REM transferidos	CICLOS	GESTACIONES	TASA GESTACIONAL
1 y < 3 millones	21	4	19,04%
3 y < 8 millones	123	37	30,08%
> 8 millones	156	32	20,51%
TOTAL	300	73	24.3%

108: TRAZABILIDAD EN LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN: BANCO DE SEMEN

J. P. Ramírez, J. L. Del Pico, A. Yoldi, A. Vaquero, J. A. Castilla
CEIFER S.L., Granada

INTRODUCCIÓN:

Se entiende como trazabilidad aquellos procedimientos preestablecidos y autosuficientes que permiten conocer el histórico, la ubicación y la trayectoria de un producto o lote de productos a lo largo de la cadena de suministros en un momento dado, a través de unas herramientas determinadas. El Real Decreto 1301/2006, que regula todo lo concerniente al funcionamiento de Bancos de Células y Tejidos Humanos establece la obligatoriedad de la trazabilidad de las células, así como de los productos y materiales que entren en contacto con dichas células. Dentro del laboratorio de reproducción el mantenimiento de la trazabilidad es más complejo en el caso del Banco de semen, ya que además de lo comentado anteriormente, la información debe estar disponible para otros laboratorios usuarios del Banco de semen.

Se ha tratado de establecer un modelo de Informe de Trazabilidad para

muestras de semen de donante. Además hacerlo visualizable a través de Internet para los Centros de Reproducción autorizados a los cuales e les suministran muestras.

MATERIAL Y MÉTODOS:

El informe de trazabilidad se ha establecido a través de la página web de CEIFER, www.ceifer.com. Se han debido informatizar todos los datos concernientes a producción de muestras, pruebas analíticas del proceso de selección de donantes, así los datos relativos a información de embarazos y resolución de estos. Se hace uso de conexiones seguras a través de SSL y de Certificados Digitales emitidos por Entidad Certificadora.

RESULTADOS:

Se ha conseguido a través de la página web establecer una zona de usuarios. La emisión e instalación de un certificado digital nos permite realizar conexiones

seguras y nominadas con los usuarios autorizados. Sólo están autorizados los Centros de Reproducción clientes del Banco de semen y sólo para visualización del informe de trazabilidad de las muestras pedidas y recibidas por su Centro. El Centro podrá ver informe que consta: Productos y fungibles utilizados para los procesos de congelación, Aparataje utilizado para congelación, Aparataje utilizado para transporte, Informes de analíticas de los procesos de aceptación de donantes, Notificación de embarazos y resolución de estos a través del mismo método.

CONCLUSIONES:

Hemos establecido un sistema que permite poner a disposición de laboratorios usuarios de banco de semen informes que garantizan la trazabilidad de las muestras de semen congelado de donante.

109: INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD LABORAL EN LA CALIDAD SEMINAL EN PAREJAS CON PROBLEMAS DE ESTERILIDAD

L. Rodríguez, M. Mandiola, A. Guembe, M. Soubelet, K. Carbonero, F. Atutxa, Y. Alvarez, A. García-Barberena.
Hospital Quirón Donostia. Unidad de Reproducción Asistida. San Sebastián.

INTRODUCCIÓN:

La calidad seminal es un factor que preocupa mucho en nuestra sociedad. Los hábitos de vida actuales (stress, sedentarismo, tóxicos...) parecen determinantes en dicha calidad. Con este trabajo pretendemos analizar si la actividad laboral influye en los parámetros estudiados. Para ello realizamos un estudio retrospectivo con los datos que disponemos de pacientes que han acudido a nuestra Unidad de

Reproducción Asistida hasta diciembre de 2008. Nuestro objetivo es valorar si la calidad seminal de nuestros pacientes se ve condicionada por la profesión que desempeñan.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Hemos clasificado las diferentes profesiones en cuatro grupos de riesgo:

Posible elevación de la T^a testicular: aquellos profesionales que pasan mucho

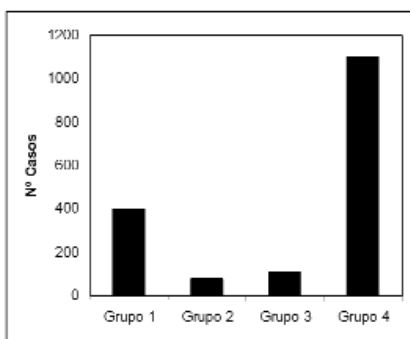
tiempo sentados (p.e. trabajos de oficina, conductores de vehículos...) y trabajos en los que la temperatura ambiente sea más elevada (p.e. fundiciones, panaderías...)

Posible exposición a agentes tóxicos: pesticidas, pinturas, barnices, trabajadores industria química...

Posible stress excesivo: profesiones relacionadas con la docencia y diferentes cuerpos de seguridad.

Grupo control: profesionales que no tienen un riesgo identificado.

Estudiamos mediante análisis estadísticos con el programa SPSS un total de 1692 casos. Los casos de distribuían de la siguiente manera:



Analizamos las siguientes variables:

volumen de eyaculado.

concentración de espermatozoides (spz).

nº total de espermatozoides en eyaculado.

porcentaje de espermatozoides progresivos totales a+b.

porcentaje de espermatozoides vivos (Hos Test).

Porcentaje de espermatozoides con morfología normal.

RESULTADOS:

Los resultados obtenidos se resumen en

	VARIABLES	U MANN-WHITNEY	SIG	DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS
CONTROL/ELEV.T*	EDAD	260782,50	,007	SI
	VOLUMEN EYACULADO	270287,000	,410	NO
	CONCENTRACIÓN SPZ	276407,500	,357	NO
	TOTAL SPZ	272496,000	,168	NO
	VITALIDAD	242113,000	,608	NO
	MORFOLOGÍA NORMAL SPZ	272246,500	,515	NO
CONTROL/TOXICO	SPZ PROGRESIVOS	277887,500	,434	NO
	EDAD	51843,000	,122	NO
	VOLUMEN EYACULADO	48636,000	,042	SI
	CONCENTRACIÓN SPZ	54831,000	,489	NO
	TOTAL SPZ	55530,500	,610	NO
	VITALIDAD	49250,000	,883	NO
CONTROL/STRESS	MORFOLOGÍA NORMAL SPZ	54628,500	,978	NO
	SPZ PROGRESIVOS	53554,000	,290	NO
	EDAD	69485,500	,008	SI
	VOLUMEN EYACULADO	68976,500	,038	SI
	CONCENTRACIÓN SPZ	71657,000	,034	SI
	TOTAL SPZ	76844,500	,344	NO
	VITALIDAD	70453,500	,881	NO
	MORFOLOGÍA NORMAL SPZ	76357,000	,594	NO
	SPZ PROGRESIVOS	76487,000	,304	NO

la siguiente tabla:

- La edad media del grupo de Tª elevada y del grupo stress son significativamente mayores que en el grupo control.

- El volumen medio de eyaculado del grupo de tóxicos es significativamente mayor que en el control.

- Hay diferencias significativas entre el grupo stress y el grupo control, siendo el volumen medio significativamente menor y la concentración media de espermatozoides significativamente mayor en el grupo stress.

CONCLUSIONES:

A pesar de observar diferencias significativas entre el grupo stress y el grupo control en el volumen medio de eyaculado y en la concentración media de espermatozoides, pensamos que lo uno compensa lo otro, ya que no se

observan diferencias significativas en la concentración total de espermatozoides en el eyaculado.

Como no observamos diferencias significativas en el número total de espermatozoides, ni en el porcentaje de espermatozoides progresivos a+b entre ninguno de los grupos estudiados, concluimos que la profesión del paciente no es clínicamente relevante.

No obstante, no podemos descartar que otros agentes específicos no estudiados aquí puedan tener un efecto directo en dicha calidad.

Nuestra conclusión definitiva es que ni la elevación de la Tª testicular, ni exposición a agentes tóxicos, ni el stress excesivo van a causar a priori una peor calidad seminal en los varones que acuden a nuestra Unidad de Reproducción a consulta de esterilidad.

110: RESULTADOS TRAS ICSI EN MUJERES CON FUNCIÓN REPRODUCTORA NORMAL. ¿INFLUYE EL ORIGEN DE LOS ESPERMATOZOIDEOS?

M. de la Orden, I. Peinado, P. Torres, J. Morera, J.M. Rubio, A. Pellicer
Servicio de Ginecología y Reproducción Humana. Hospital Universitario La Fe. Valencia

INTRODUCCIÓN:

Al igual que la viabilidad de los espermatozoides utilizados para ICSI es crucial, también el origen de los espermatozoides puede ser un factor limitante. En la bibliografía se reporta

que la motilidad de los espermatozoides inyectados y su origen testicular o eyaculado es un factor predictivo importante en términos de fecundación, embarazo y tasa de gestación, aunque no se reportan diferencias significativas en los valores resultantes. Así mismo, el

uso de espermatozoides testiculares para ICSI está indicado exclusivamente en pacientes azoospermicos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio descriptivo retrospectivo de

2754 ciclos realizados entre enero de 2005 y abril de 2009 en el Servicio de Reproducción Humana del HU La Fe de Valencia. Se analiza la tasa de gestación y tasa de aborto dependiendo del origen de los espermatozoides (eyaculado, testículo y epidídimo) de mujeres diagnosticadas con Función Reproductora Normal a las que se les practicó la técnica de ICSI. Para el análisis estadístico se utilizó el SPSS 15.0 (Se ha realizado un Chi cuadrado ($p > 0.05$) resultando p valor igual a 0.098)

33.87 ± 3.42 y los hombres de 36.21 ± 4.83 con un REM medio de 23.94 ± 23.82 . Se evidencia la no existencia de diferencias significativas respecto a la tasa de gestación y tasa de aborto dependiendo del origen de los espermatozoides de eyaculado frente a espermatozoides de origen testicular que incluye espermatozoides de testículo y epidídimo (31.7% vs. 41.8% p valor 0.059). La tasa de gestación en el grupo de pacientes criptozoospermicos comparada con la tasa de gestación con espermatozoides

CONCLUSIONES:

La elevada tasa de gestación en el grupo de espermatozoides testiculares podría explicarse según la bibliografía ya que la incidencia de fragmentación de DNA es menor con espermatozoides testiculares comparado con eyaculado. Si bien es cierto que no se observan diferencias en la tasa de gestación y aborto según el origen del gameto masculino, cuando acotamos los resultados en el eyaculado al grupo de pacientes criptozoospermicos (concentración < 1 mill spz/ml) y la comparamos con la tasa de gestación con espermatozoides de epidídimo y de testículo se obtienen diferencias significativas respecto al grupo de testículo. A la vista de los resultados y en pacientes seleccionadas el uso de spz testiculares para IVF/ICSI podría considerarse incluso cuando espermatozoides móviles se identifican en el eyaculado.

ORIGEN SPZ	N	TG	TA
Eyaculado	2676	(849/2676) 31.7%	(134/849) 16%
Epidídimo	26	(8/26) 30.8%	(0/8) 0%
Testículo	52	(25/52) 48.1%	(4/25) 16%
Criptozoospermicos	50	(12/50) 24%	(2/12) 16.7%

RESULTADOS:

El análisis estadístico de la muestra revela una media de edad de las mujeres de

de epidídimo y de testículo es 24% vs. 30.8% vs. 48.1% y se obtienen diferencias significativas respecto al grupo de testículo (p valor 0.011).

111: EXPERIENCIA DE LA CLASIFICACIÓN EMBRIONARIA ASEBIR EN EL INSTITUTO BERNABEU DE CARTAGENA

C. Pérez, M. Pérez, F. Araico, R. Bernabeu, J. Ten
Instituto Bernabeu, Cartagena, Murcia

INTRODUCCIÓN:

En el año 2007 ASEBIR elaboró una clasificación embrionaria, basada en la calidad y capacidad de implantación de los preembriones, en la que se establecen 4 categorías (A: óptima calidad; máxima capacidad de implantación; B: buena calidad; elevada capacidad de implantación; C: regular calidad; posibilidad de implantación media; D: mala calidad; posibilidad de implantación baja). Tras su publicación han sido varios los grupos que han evaluado la eficacia de esta clasificación tras su aplicación en el laboratorio (Torelló et al., 2006; Ten J. et al., 2007). El objetivo de este trabajo es verificar la validez de esta clasificación embrionaria desde nuestra propia experiencia.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se trata de un estudio retrospectivo en el que se comparan las tasas de embarazo clínico e implantación de las categorías de clasificación embrionaria ASEBIR. Se llevaron a cabo un total de 184 transferencias puras, sin mezcla de embriones de distintas categorías, procedentes de ciclos FIV/ICSI realizados en nuestro centro desde Enero de 2008 a Marzo de 2009. Se excluyen los ciclos de donación de ovocitos. El análisis estadístico fue llevado a cabo con el paquete SPSS.

RESULTADOS:

La edad materna y paterna y el número medio de embriones transferidos en cada categoría fueron homogéneos. Las tasas de embarazo clínico fueron las siguientes: A: 45.6%, B: 39.2%, C: 20.8% y D: 17.1%, habiendo diferencias

estadísticamente significativas entre la categoría A con la C y con la D y la categoría B con la D. Por su parte, las tasas de implantación fueron: A: 34.1%, B: 33.3%, C: 16.3% y D: 11.1%, encontrándose diferencias significativas entre la categoría A con la C y con la D y la categoría B con la C y con la D. Cuando consideramos una tasa de implantación del 100% más el 0% dentro de cada categoría, observamos que las tasas de implantación fueron: A: 28,0%, B: 26,7%, C: 8,3% y D: 4,4%, habiendo también diferencias significativas entre A con C y D y B con C y D. Solamente el 5,8% de los embriones tipos A y B consiguieron implantar.

CONCLUSIONES:

Nuestros datos indican que los embriones catalogados como A y B

presentan posibilidades similares de implantar. Lo mismo ocurre con los embriones C y D, los cuales no difieren en su capacidad implantatoria.

La clasificación embrionaria de ASEBIR nos permite, por tanto, discernir los embriones óptimos de los de mala calidad, pero no "afina" en discriminar los óptimos de los buenos y los regulares

de los malos. Un nuevo análisis con mayor número de casos nos permitirá volver a evaluar los criterios ASEBIR y validarlos.

112: INFLUENCIA DE LOS DIAS DE ESTIMULACIÓN EN LOS RESULTADOS DE ICSI

A. Fernández, R. P. Cotarelo, A. Clavero, R. Ruiz de Assin, S. Zamora, J. Fontes, M. Roldán, R. López-Jurado.
U. Reproducción Hospital Virgen de las Nieves, Granada

INTRODUCCIÓN:

El resultado de los ciclos FIV/ICSI depende de variables relacionadas con la pareja (edad de la mujer, causa de esterilidad, etc.) y de otras variables que dependen los tratamientos de estimulación de la ovulación (tipo, dosis, etc.), existiendo controversia sobre si la duración de dichos tratamientos se relaciona con los resultados de FIV/ICSI.

En este estudio nos proponemos conocer los resultados de ciclos de fecundación in vitro (FIV-ICSI) en función a los días de estimulación.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se han analizado los resultados de 910 ciclos de inducción de la ovulación por causa masculina, tubárica o esterilidad de origen desconocido en mujeres de 35 años o menos en nuestro Hospital entre los años 2006 y 2008, distinguiendo 3 grupos:

< 10 días de estimulación ($8 \pm 1,2$): 372 ciclos

-entre 10 y 14 días de estimulación ($11,24 \pm 1,2$): 508 ciclos

->14 días de estimulación ($16,9 \pm 2,7$): 30 ciclos

Los resultados se analizan por separado en función a si se trata de ciclos con análogos o con antagonistas.

RESULTADOS:

De los 755 ciclos con análogos, en 298 la estimulación duró menos de 10 días, en 434 duró entre 10 y 14, y en 23 duró más de 14 días. Las tasas de gestación fueron para cada grupo respectivamente:

-gestación por ciclo: 24,2% vs. 23,3% vs. 17,4%

-gestación por punción: 33,6% vs. 25,8% vs. 20%

-gestación por transferencia: 38,3% vs. 30,3% vs. 20%

De los 155 ciclos con antagonistas, en 74 la estimulación duró menos de 10 días,

en 74 duró entre 10 y 14 días, y en 7 duró más de 14 días. En los 7 ciclos con más de 14 días no se consiguió ningún embarazo. Para los otros dos

-grupos, las tasas de gestación fueron respectivamente:

-gestación por ciclo: 31,3% vs. 25,7%

-gestación por punción: 35,9% vs. 26,7%

-gestación por transferencia: 41,8% vs. 28,8%

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos de estimulación.

CONCLUSIONES:

A partir de 15 días de estimulación, los resultados empeoran considerablemente, aunque sería necesario un mayor número de muestra para obtener diferencias estadísticamente significativas. No se encuentran diferencias entre los grupos de <10 días y de 10-14 días.

113: CALIDAD EMBRIONARIA: UNA PROPUESTA METODOLOGICA PARA SU MEDICIÓN Y EVALUACIÓN

I. Molina, A. Debon
Unidad de Reproducción Humana. Hospital Universitario La Fe, Valencia

INTRODUCCIÓN:

En las unidades de Reproducción Humana es imprescindible mejorar los

conocimientos sobre el potencial de implantación de los embriones para poder elegir los realmente mejores antes de su transferencia. A través de la

valoración de sus características morfológicas podemos establecer un ranking que permita su selección de forma que se reduzcan las tasas de

embarazos múltiples sin disminuir las tasas de gestación.

MATERIAL Y METODOS:

En el presente trabajo se realiza un estudio retrospectivo de 5242 ciclos de FIV-ICSI con transferencia de 1, 2 o 3 embriones en día 2 realizados en la Unidad de Reproducción Humana de nuestro centro desde enero de 2003 hasta enero de 2007. Los embriones se clasificaron en función del número de células con valores 2, 3, 4, 5 y 6 y el grado de fragmentación y simetría de las blastómeras con valores 1, 2, 3 y 4. El destino exacto o potencial de implantación de cada embrión solo se puede conocer en las gestaciones simples de un solo embrión transferido, en las gemelares de dos embriones transferidos o en las triples de tres embriones transferidos. Por esta razón de los 5242 ciclos considerados se seleccionaron las mujeres que no consiguieron gestación con independencia del número de embriones transferidos (1, 2 o 3 embriones; n= 3577) y las que consiguieron gestación con el mismo

número de sacos que de embriones transferidos (n= 326).

RESULTADOS:

De los resultados del modelo se deduce que el paso de 2 a 3 células no produce incremento significativo en el logit de la probabilidad y por tanto pueden unirse en una misma categoría, lo mismo puede decirse del grado 2 respecto del 1. De la ecuación de nuestro modelo puede obtenerse una puntuación asociada a cada combinación de variables embrionarias que nos permite ordenarlos en base a su calidad medida en términos de implantación, el cálculo del embryony quality index (EQI) correspondiente a cada mujer se realiza por suma de dichas puntuaciones. La validación de nuestro modelo en el total de los datos se ha realizado mediante la curva de ROC que proporciona una representación global de la exactitud del método. El efecto del embryony quality index (EQI) y la edad de la mujer sobre la implantación se evaluó utilizando generalised linear models (GLM) with continuous predictors. La metodología aquí empleada nos ha permitido no tener

que realizar transformaciones en las variables e identificar diferencias entre valores de la variable, lo que simplifica el modelo a la vez que supone una ventaja frente a las propuestas de otros autores.

CONCLUSIONES:

Sugerimos una puntuación de los embriones incorporando sólo dos variables que permite optimizar la selección de los embriones, sobretudo en casos dudosos donde no poseemos embriones de 4 células grado1. Tanto nuestra metodología como los resultados mejoran los ya obtenidos por otros autores. En conclusión, nuestro modelo proporciona una herramienta que permite tomar decisiones rápidas en el momento de elegir los mejores embriones para su posterior transferencia. Además hemos propuesto la curva ROC como herramienta gráfica y el valor AUC como medida numérica para la validación y comparación de distintos modelos. Este modelo puede también ser utilizado en aquellas bases de datos en las que, al igual que la nuestra, las variables igualdad y simetría están agrupadas en la variable grado.

114: TRANSFERIR EN D+4/D+5 VS D+3 MEJORA LA TASA DE EMBARAZO CLÍNICO TRAS ICSI EN MUJERES CON E2 PREHCG ELEVADO DE DUDOSO PRONÓSTICO IMPLANTATORIO

T. Rubio², L. Gil¹, M. Poveda¹, J. Manuel Moreno¹, J. J. López-Gálvez¹, M. Lloret¹, J. Rueda³, C. Carrascosa², E. López²,

¹Unidad de Reproducción y ³Genética Hospital Clínica Vistahermosa, Alicante y ²Unidad de Reproducción Hospital Clínica Virgen de La Vega, Murcia.

INTRODUCCIÓN:

Objetivos: Determinar si en mujeres con E2 preHCG moderadamente elevado (3000-5000 pg/ml), la probabilidad de conseguir embarazo clínico tras FIV varía en función del estadio embrionario (D+4/D+5 vs D+3) y otras variables definidas en material y métodos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio observacional retrospectivo realizado en las Unidades de Reproducción de Clínica Vistahermosa

de Alicante y Clínica Virgen de la Vega de Murcia. Se revisan nuestros últimos ciclos de FIV/ICSI, excluyendo ciclos de donación de ovocitos, donación de embriones y criotransferencias. De los ciclos iniciales se encontraron 50 con E2 preHCG > 3000 pg/ml. De este grupo se seleccionaron 30 ciclos con E2 entre 3000 y 5000 pg/ml (no superando la mayoría de ellos los 4000 pg/ml), que constituyen nuestro grupo de estudio, Grupo A. Y se seleccionó otro grupo como control, Grupo B, constituido por 30 ciclos con valores de E2 <3000 pg/ml, aleatorizados. Se analiza: edad, días de

cultivo (D+4/D+5 vs D+3), días de administración de progesterona, nº de ovocitos MII, nº de embriones obtenidos, calidad de los embriones transferidos según criterios ASEBIR, nº de embriones transferidos, % de implantación, % embarazo clínico/transfer, % SHO. Significación estadística: Chi Cuadrado y T de Student.

RESULTADOS:

Los grupos A y B son similares respecto a edad, días de administración de progesterona, calidad y número de los

embriones transferidos. El número de ovocitos MII recuperados y embriones obtenidos fue superior en el grupo de estradiol elevado comparado con el control, pero no significativo. Al calcular la tasa de embarazo clínico/transfer entre ambos grupos, no observamos diferencias significativas (grupo A 33.3% vs grupo B 23.3%, $p>0.05$). Tampoco se han observado diferencias en la tasa de implantación entre los dos grupos. Sin embargo, al relacionar la tasa de embarazo en función de la variable días de cultivo dentro de nuestro grupo de estudio, grupo A, observamos que al transferir en

D+4/D+5, el grado de embarazo/transfer (41,1%) es superior comparado con el transfer en D+3 (23%), aunque las diferencias no son significativas ($p>0,05$). En el grupo control esta tasa de embarazo/transfer-días de cultivo es similar (D+4/+5, 25% vs D+3, 22,2%, $p>0,05$). No hemos observado SHO severo en ninguna paciente de nuestros grupos.

CONCLUSIONES:

La realización de transferencia embrionaria D+4/D+5 en pacientes con cifras de E2 preHCG comprendidas entre

3000 y 5000 pg/mg, comparado con transferir en D+3, mejora notablemente la tasa de embarazo clínico/transfer (41%), aunque no alcanza criterio de significación estadística, probablemente debido a los pocos ciclos analizados hasta la fecha actual. Estos resultados, sugieren la importancia de diferir la transferencia en uno o dos días más de lo habitual en pacientes con estradiol elevado (3000-5000 pg/ml) y de dudoso pronóstico endometrial, sobretodo al comprobar que la calidad de los embriones transferidos en ambos grupos fue similar.

115: ¿INFLUYEN NUESTROS PROTOCOLOS DE ESTIMULACION EN LAS TASAS DE ÉXITO?

C. Olmedo, J. Díaz García-Donato, M. J. Catalá, E. Pau, B. Ramos, M. Benavent, V. Martín.
Unidad de Reproducción Asistida Hospital Quirón Valencia

OBJETIVOS:

Pretendemos mediante una cohorte retrospectiva, analizar los distintos protocolos de estimulación ovárica que condujeron a embarazo. Comprobaremos si ciertos protocolos de estimulación producen mayor tasa de embarazo.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Para realizar este estudio disponemos de los datos de la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital Quirón de Valencia referentes a todas las pacientes que se sometieron a técnicas de fecundación in vitro mediante ICSI (Intra-Citoplasmatic Sperm Injection), entre Enero de 2006 y Diciembre de 2008, obteniéndose un embarazo clínico tras el tratamiento. En este estudio incluimos 314 pacientes de edades comprendidas entre 27 y 49 años, con infertilidad de origen tubárico, Síndrome de ovario poliquístico, endometriosis, fallo ovárico o esterilidad de origen desconocido como principales causas de infertilidad. Han sido excluidas del estudio las pacientes con antecedentes de síndrome de hiperestimulación ovárica, las sometidas a tratamientos

oncológicos, las pacientes con patología materna grave y aquellos pacientes cuyos sémenes no fueron obtenidos de eyaculado en fresco.

La cohorte fue dividida principalmente en dos grupos A y B en función de si la supresión hipofisaria había sido llevada a cabo por un antagonista de la GnRH o por un agonista. A su vez, tanto A como B fueron subdivididas en grupos del 1 al 5 dependiendo de si las pacientes recibieron: 1) FSH recombinante, 2) FSH urinaria ultra purificada, 3) (FSH+LH) recombinante 4) (FSH+LH) urinaria ultra purificada y 5) FSH+LH mixto.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para analizar los datos se recurrió a un estudio de cohorte retrospectiva. En él se identificó una cohorte expuesta en el pasado a un factor de riesgo (tipo de protocolo de estimulación ovárica controlada), y otra cohorte no expuesta. Para comparar los resultados se usó el Riesgo Relativo (RR). Es una medida de asociación en el estudio de cohortes que mide la incidencia en expuestos frente a la incidencia en no expuestos. Cuando el valor es igual a la unidad lo

consideraremos indiferente. Si es superior a la unidad diremos que la exposición constituye un factor de asociación positiva, y si es inferior a la unidad diremos que la exposición es un factor de asociación negativa.

Además calcularemos la Fracción Atribuible en Expuestos (FAE), que es el porcentaje de embarazo debido a la exposición y que por tanto sería el porcentaje de nuevos casos de embarazo, entre los expuestos, que perderíamos si no usásemos ese protocolo de estimulación. Dicho factor se calcula restando la incidencia en expuestos menos la incidencia en no expuestos.

RESULTADOS:

Para los grupos que recibieron LH, tanto recombinante como urinaria, no se observó asociación positiva. Tampoco en los grupos mixtos. Sin embargo, sí se obtuvo una asociación positiva en el grupo de antagonistas de la GnRH que recibió FSH recombinante (RR=1,33) y en los grupos de agonistas que recibieron FSH recombinante (RR=2,53) y FSH urinaria ultra purificada (RR=1.91) y la fracción atribuible en

expuestos para estos grupos fue de un 8%, 38% y 24% respectivamente.

CONCLUSIONES:

A la vista de los resultados, podemos concluir que aquellos protocolos de estimulación que incluyen FSH recombinante para el grupo de agonistas y antagonistas, o FSH urinaria para el

grupo de agonistas producen una mayor tasa de embarazo. Además, el no usar tales tipos de protocolos implicaría una reducción considerable en el porcentaje de nuevos casos de embarazo.

116: TRANSFERENCIA SELECTIVA DE DOS EMBRIONES: NUESTRA EXPERIENCIA

R. Mendoza, V. Aparicio; B. Corcóstegui, L. Crisol, A. Expósito, R. Matorras, T. Mnez-Astorquiza
Unidad de Reproducción Humana. Hospital de Cruces-Baracaldo. Vizcaya

INTRODUCCIÓN:

Objetivos: Disminuir la tasa de gestaciones múltiples en los ciclos de FIV-ICSI. Para ello analizamos en este estudio el impacto que tiene la Transferencia Embrionaria Selectiva de dos embriones (TSE) en las tasas de gestación y embarazo múltiple en los ciclos de FIV/ICSI.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se estudiaron retrospectivamente 1998 transferencias embrionarias realizadas en nuestra Unidad de Reproducción desde enero de 2004 hasta abril de 2009. Se analizaron número de transferencias totales, nº de transferencias selectivas, tasas de gestación por transferencia y tasas de gestación múltiple. Las transferencias selectivas se llevaron a cabo los años 2007 y 2008 en pacientes en primer ciclo, menores de 36 años y que tenían más de 2 embriones de Tipo A. A partir de enero de 2009 se modifican los criterios de transferencia selectiva de manera que a las pacientes < 33 años, en 1º ciclo se transfieren 2 Embriones siempre, salvo que sean de Tipo D y a las

pacientes de 33 a 37 años en 1º ciclo, 2 Embriones Tipo A o B.

RESULTADOS:

Se expresan en la siguiente tabla.

	NO TSE (2004-2006) 36.89% ^a (405/1098)	TSE inicial (2007-2008) 42.29% ^{a,c} (321/759)	TSE ampliada Enero-Abril 2009 33.33% ^c (47/141)
Tasa embarazo/transferencia	24.50% ^b (98/400)	26.79% ^c (86/321)	12.82% ^{b,c} (5/39)
Tasa embarazo múltiple	20.75% (83/400)	22.64% (72/318)	12.82% (5/39)
Gemelar	3.75% (15/400)	3.77% (12/318)	0
Triple	0	0.31 (1/318)	0
Cuádruple	0%	9.22% (70/759)	22.69% (32/141)
% TSH	0% (0/1098)	62.85%	59.38%
Tasa embarazo TSH	-	-	-

a: p<0.05: NO TSE vs TSE inicial
b: p<0.05: NO TSE vs TSE ampliada
c: p<0.05: TSE inicial vs TSE ampliada

Durante el primer periodo de transferencia selectiva de embriones (TSE inicial 2007-2008) no encontramos diferencias entre las tasas de embarazo por transferencia ni en las tasas de gestación múltiple con respecto a los datos de los años 2004 a 2006. Sin embargo, cuándo cambiamos los criterios de transferencia selectiva (TSE

ampliada enero-abril 2009), disminuyen significativamente, p<0.05, tanto la tasa de embarazo por transferencia como la tasa de gestaciones múltiple.

CONCLUSIONES:

La aplicación de los criterios ampliados de TSE se asoció a una significativa disminución de los embarazos múltiples, pero también a un descenso en las tasas de embarazo. No obstante, habida cuenta de las implicaciones del embarazo múltiple, la TSE se debe aplicar con los mencionados criterios.

117: CRIOPRESERVACIÓN TERAPÉUTICA DE SEMEN EN VARONES ONCOLÓGICOS

I. Molina, C. C. Duque, J. V. Martínez, J. Morera, J. M. Rubio.
Unidad de Reproducción Humana (Servicio de Ginecología). Hospital Universitario la Fe, Valencia

INTRODUCCIÓN:

La criopreservación terapéutica de semen (CTS) para su posterior utilización en

Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) es una alternativa eficaz para aquellos varones que van a ser sometidos a tratamientos genotóxicos y/o esterilizantes.

MATERIAL Y METODOS:

Se estudiaron 70 CTS que acudieron a control a los 6, 12 y 18 meses tras

finalizar el tratamiento. Solo se incluyeron las muestras que presentaron espermatozoides móviles en el eyaculado y se criopreservaron con independencia del tratamiento oncológico recibido.

Se evaluó la concentración y movilidad de la muestra en el momento de la CTS. Los varones acudieron al primer control a los 6 meses tras finalizar el tratamiento valorándose de nuevo la concentración y la movilidad de la muestra. Los varones que fueron azoospermicos en el primer control, fueron citados 6 y 12 meses después.

RESULTADOS:

En el momento de la CTS 58 varones (83%) presentaron una oligoastenozoospermia (Concentración < 20 millones /ml y movilidad a+b < 50%) y

solo 12 varones (17%) fueron normozoospermicos. A los 6 meses de finalizar el tratamiento el 36 % de los varones fueron oligoastenozoospermicos, el 43 % normozoospermicos y solo un 21 % de los varones presentaron una azoospermia post tratamiento.

De los 15 varones azoospermicos 3 (20%) recuperaron la fertilidad a los 12 meses post tratamiento y los 12 restantes seguían siendo azoospermicos a los 18 meses. De los 12 varones azoospermicos, 4 utilizaron la muestra criopreservada para TRA realizándose 8 ciclos de ICSI. La edad media de las mujeres fue de 31.25 años,

obteniéndose una tasa de gestación del 25% y una tasa de implantación del 11.76%.

CONCLUSIONES:

El estado clínico y emocional del varón influye notablemente sobre la concentración y sobre la movilidad. Sin embargo se observa una mejora importante de estos parámetros seminales a los 6 meses tras finalizar el tratamiento. La tasa de recuperación de la fertilidad es muy elevada hasta los 6-12 meses y no se ve incrementada en los controles de los 18 meses.

	CTS N=70	Control 6 meses	Control 12 meses	Control 18 meses
Normozoospermia	12 (17%)	30 (43%)		
Oligoastenozoospermia	58 (83%)	25 (36%)		
Azoospermia		15 (21%)	12 (17%)	12 (17%)

118: EFECTO DEL CAMBIO DE MEDIO EMBRIONARIO EN DÍA 2 EN UN PROGRAMA DE CULTIVO PROLONGADO.

J. Guerrero, J. Ten, A. Rodríguez-Arnedo, M. Á. Carracedo, J. Llácer, R. Bernabeu
 Instituto Bernabeu Alicante

INTRODUCCIÓN:

Existen numerosos estudios que asocian la transferencia en estadio de blastocisto con un incremento en las tasas de implantación debido, probablemente, a una selección embrionaria más objetiva una vez se ha producido la activación del genoma embrionario. Esto permitiría transferir menos embriones, reduciendo el riesgo de embarazo múltiple sin comprometer el éxito del tratamiento. Uno de los inconvenientes del cultivo largo es la sobrecarga de trabajo que supone para el laboratorio ya que, además de ser necesarias un mayor número de observaciones, hay que pasar los embriones de un medio de cultivo inicial a un medio específico que cubra las necesidades metabólicas y nutricionales hasta el estadio de blastocisto. De forma rutinaria este proceso se realiza en el

tercer día de cultivo. En ocasiones, en nuestro laboratorio se lleva a cabo en día 2 con el fin de evitar un exceso de trabajo en momentos puntuales. El objetivo de este estudio es evaluar si esta estrategia tiene algún efecto negativo sobre el potencial de implantación embrionario y las tasas de gestación.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se trata de un estudio retrospectivo en el que se analizan 91 transferencias en día 5 de embriones que previamente se pasaron a CCM® (Vitrolife, Goteborg, Suecia) en día 3 (grupo I, n = 48) o alternativamente en día 2 (grupo II =43) dentro de nuestro programa de FIV/ICSI. Para el análisis estadístico empleamos el paquete SPSS.

RESULTADOS:

La edad materna (34,40 ± 3,67 vs. 34,02 ± 4,13), número de ovocitos recuperados (16,58 ± 6,44 vs. 17,42 ± 7,34), número de embriones que se llevan a cultivo largo (9,75 ± 4,60 vs. 9,02 ± 3,63) y el número de blastocistos formados en día 5 (4,74 ± 3,21 vs. 4,68 ± 2,52) fueron similares en el grupo I comparados con el grupo II. El número de embriones transferidos fue mayor en el grupo II (2,05 ± 0,49) que en el grupo I (1,83 ± 0,56), aunque no alcanzó significación estadística. No se observaron diferencias en los parámetros clínicos más relevantes, como la tasa de -HCG positiva (64,6% vs. 65,1%), tasa de embarazo clínico (52,1% vs. 55,8%) y tasa de implantación (40,6% vs. 39,9%). Las tasas de aborto en el primer trimestre entre ambos grupos fueron comparables.

CONCLUSIONES:

El cambio de medio de cultivo desde el día 2 no supone un estrés metabólico para el embrión y, por tanto, no afecta a las tasas de éxito. Los criterios

morfológicos en día 2 son tan válidos como predictores de la formación de blastocistos como los de día 3. Esto también proporciona una mayor

flexibilidad a la hora de organizar las tareas del laboratorio.

119: CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE DONANTE QUE AFECTAN A LOS RESULTADOS DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

A. Zurilla, A. Mencías, C. Rico, Y. Márquez, P. Rodríguez, N. Garrido
IVI, Valencia

INTRODUCCIÓN:

La inseminación artificial con semen de donante anónimo es una técnica de reproducción asistida empleadas desde hace décadas para solventar los problemas de infertilidad principalmente a causa de la presencia de un factor de infertilidad masculino severo, o en mujeres sin pareja masculina.

Las posibilidades de éxito encontradas en la literatura son muy distintas, pero suelen variar entre un 10% y un 25% por intento, y aproximadamente el 70% de tasa de gestación acumulada en 4 intentos.

El hecho de que un porcentaje importante de los tratamientos no tengan éxito, así como la alta tasa de rechazo de potenciales donantes de semen, que obliga a optimizar las muestras de semen disponibles, hacen que sea de gran interés determinar que valores del semen influyen en los resultados de los tratamientos.

Nuestro objetivo con el presente estudio es determinar que parámetros del semen de donante repercuten en las posibilidades de lograr una gestación en inseminación artificial con semen de donante.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio de casos y controles retrospectivo, donde se identificaron en nuestra base de datos informatizada inseminaciones artificiales con semen

de donante, donde se obtuvieron los datos de los parámetros básicos del semen, para ser posteriormente comparados entre los tratamientos que lograron una gestación y los que no.

Se utilizaron tests estadísticos de T de Student para la comparación de las medias de la combinación de concentración, movilidad, volumen en el total de espermatozoides móviles progresivos, y del porcentaje de formas con movilidad A+B en fresco y tras capacitar, en ambos días de la inseminación.

RESULTADOS:

de un total de 1587 inseminaciones, se obtuvo gestación en 428 de ellas (26,96%).

CONCLUSIONES:

Si se cumplen unos criterios mínimos para garantizar las máximas tasas de gestación en inseminación artificial con semen de donante, no hay ningún parámetro del semen que influya en la consecución de una gestación desde el punto de vista clínico, aunque el elevado número de casos confirme una diferencia estadísticamente significativa.

	GESTACION N	Media	Desviación típ.	P
Total mov.	NO	23,57	14,14	,038
Progres fresco día 1	SI	25,21	14,07	
Total mov.	NO	23,91	14,57	,807
Progres fresco día 2	SI	24,11	14,55	
Total mov.	NO	3,91	2,19	,004
Progres capacitado día 1	SI	4,27	2,42	
Total mov.	NO	4,07	2,32	,776
Progres capacitado día 1	SI	4,11	2,25	
% móviles A+B fresco día 1	NO	26,28	10,28	,003
	SI	28,01	10,13	
% móviles A+B fresco día 2	NO	39,28	14,94	,018
	SI	41,27	14,75	
% móviles A+B capacitado día 1	NO	25,93	10,48	,001
	SI	27,87	10,31	
% móviles A+B capacitado día 2	NO	37,31	16,01	,000
	SI	40,43	15,59	

120: PROTEÓMICA: UNA PODEROSA HERRAMIENTA

A. Expósito¹, R. Matorras¹, L. Crisol¹, R. Mendoza¹, D. Nagore², A. Ametzazurra²

¹Unidad de Reproducción Humana, Hospital de Cruces, Barakaldo (Bizkaia) España. ²Proteomika S.L., Parque Tecnológico de Bizkaia, Derio España.

INTRODUCCIÓN:

Entre los objetivos principales de la Medicina Reproductiva se encuentra la utilización a medio plazo de sistemas más completos de valoración de la calidad embrionaria basados en parámetros no morfológicos. Tecnologías como la proteómica aportan una imagen dinámica de todas la proteínas expresadas por los embriones in Vitro.

OBJETIVO:

Cuantificación simultánea de citoquinas en los sobrenadantes de cultivos embrionarios mediante el kit High Sensitivity Human Milliplex TM MAP (Millipore).

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se han analizado 20 muestras (25 µl cada una) de sobrenadante de cultivo de embriones tras 24 horas de incubación en el mismo.

Se estudian simultáneamente en el medio de cultivo la siguiente batería de citoquinas humanas: IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IFNg, GM-CSF y TNFa.

El kit incluye un estándar de cada citoquina (citoquina stock a una concentración conocida, a partir de la cual se realiza una curva estándar), y como control de calidad, una mezcla de todas las citoquinas a la concentración mínima detectable (QC-1) y máxima detectable (QC-2). Como control negativo se ha utilizado el buffer en el que se han diluido las muestras, los controles de calidad y los estándares.

La concentración de cada citoquina presente en la muestra se obtiene extrapolando la fluorescencia emitida en la curva estándar de cada citoquina.

RESULTADOS:

En general, la fluorescencia obtenida por las distintas citoquinas analizadas ha sido muy baja y en la mayoría de los casos por debajo del límite de detección del ensayo. Tan sólo hemos obtenido valores cuantificables para las citoquinas IL-4, IL-5, IL-8 y IL-10.

CONCLUSIONES:

El análisis de citoquinas en el sobrenadante de cultivo de embriones como método cuantitativo no invasivo para la selección de embriones es inviable bajo las condiciones experimentales utilizadas en este ensayo. Debemos seguir investigando en esta línea para desarrollar métodos embrionarios no invasivos ni subjetivos para la evaluación de la calidad embrionaria, que permitan la selección del embrión óptimo para su transferencia al útero.

121: TRANSFERENCIAS DE EMBRIONES CRIOPRESERVADOS: ¿CUÁL ES EL NÚMERO ÓPTIMO A TRANSFERIR?

C. Luna, B. Péramo, E. Olaya, C. Muñoz, A. García, C. Cordero, S. Cortés, M. Gago, R. Núñez, P. Caballero Peregrín.

Clínica Tambre - Madrid

INTRODUCCIÓN:

La transferencia de un único embrión con el fin de minimizar la posibilidad del embarazo múltiple se está volviendo algo común, pero es menos habitual con embriones descongelados. Se ha visto que la tasa de embarazo con embriones descongelados es mas baja que usando embriones en fresco, sin embargo la transferencia de embriones descongelados aumentan la tasa de embarazo acumulativa, reduce los costes y es un proceso mucho más sencillo que se realiza en un periodo de tiempo más corto comparado con los ciclos en fresco. Por supuesto, se debe disponer de un buen programa de criopreservación de embriones.

Este estudio pretende valorar el número óptimo de embriones a transferir en ciclos de descongelación, con el fin de minimizar las posibilidades de embarazo múltiple.

MATERIAL Y METODOS:

Se estudiaron retrospectivamente los ciclos de descongelación de embriones realizados en la Clínica Tambre durante los años 2007 y 2008. El criterio para la congelación fue: al menos 2 blastómeras en día +2, al menos 4 blastómeras en día +3, seleccionando solo aquellos de buena calidad. No se incluyeron blastocistos. Los embriones fueron congelados con medios Vitrolife (Sweden), y congelador NiCool (Air

Liquide), siguiendo los protocolos del fabricante. La descongelación se realizó con los mismos medios, el mismo día de la transferencia.

El protocolo de ciclo de descongelación fue: comenzó con estrógenos (Progynova, Schering 6mg/día) el día 2 del ciclo. Se valoró el grosor endometrial el día 8, y se comenzó con la Progesterona (900 mg/día) 2 ó 3 días antes de la transferencia, dependiendo del día en que los embriones fueron criopreservados. Se realizó -hCG sérica a los 14 días post-transfer. Si el test de embarazo fue positivo, se continuó con los estrógenos y progesterona hasta la semana 14 de embarazo.

RESULTADOS:

Se realizaron 690 descongelaciones, de los que se realizó transferencia en 636 (92% de los ciclos).

Se separaron en 3 grupos: Gr. 1 (transferencia de 1 embrión); Gr. 2 (transferencia de 2 embriones); Gr. 3 (transferencia de 3 embriones).

Se realizó un test 2 para comparar los grupos, el valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1:

Número de embriones transferidos	Gr. 1		Gr. 2		Gr. 3	
	β hCG -	β hCG +	β hCG -	β hCG +	β hCG -	β hCG +
N	92	17	275	136	74	42
Emb BQ		4		31		8
1 saco		13		87		27
2 sacos		0		18		5
3 sacos		0		0		0
Emb ectópico		0		0		2
Abortos		3		20		7

Tabla 1. Número de embriones transferidos, y número de sacos gestacionales.

De los 636 ciclos realizados se obtuvieron 195 embarazos (30,7%). Las tasas de embarazo según los embriones transferidos se muestran en la Tabla 2. Cuando se transfirieron 3 E la tasa de embarazo fue más alta ($p < 0,05$) y además no se obtuvo ningún embarazo triple. Además, la tasa de gemelares fue similar, sin diferencias significativas.

Número de E transferidos	N	Tasa de embarazo	Tasa embarazo múltiple
1	109	15,6	0
2	411	33,1	13,2
3	116	36,2	12,2

Tabla 2. Tasa de embarazo dependiendo del número de embriones transferidos, y tasa de embarazo múltiple.

CONCLUSIONES:

Consideramos que en ciclos de congelación de embriones es una buena elección, siempre que sea posible, la transferencia de 3 E, ya que aumenta la posibilidad de embarazo, mientras que la de embarazo múltiple es similar que si transferimos 2 E, a la vez que un embarazo triple no ha sido observado hasta el momento.

122: ¿DEPENDE LA DECISIÓN DE CRIOPRESERVAR UN EMBRIÓN DEL OBSERVADOR?

R. Ruiz de Assin, J. A. Castilla, B. Romero, S. Zamora, A. Fernández, M. Roldán, R. P. Cotarelo, R. López-Jurado.
U. Reproducción Hospital Virgen de las Nieves, Granada

INTRODUCCIÓN:

Hasta ahora diversas Sociedades Científicas, como ASEBIR, han tratado de estandarizar criterios a la hora de realizar la evaluación embrionaria, como se hace patente en la publicación de las dos ediciones del Cuaderno de Embriología Clínica II. Esto, unido a la política de reducción del número de embriones a transferir para evitar el embarazo múltiple, establece una serie de criterios para la elección del número y el tipo de embriones a transferir.

OBJETIVO:

Este estudio pretende llamar la atención

sobre la falta de criterios estandarizados a la hora de decidir si un embrión debe o no, ser congelado.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se compararon los resultados obtenidos en el programa español de control de calidad externo de evaluación embrionaria, con los de un grupo de cinco expertos miembros del grupo de trabajo de calidad embrionaria de ASEBIR. Se compararon las imágenes de cigotos y embriones en Día 2 y 3 y se les preguntó, en el caso de los cigotos cuales mantendría en cultivo, congelaría y desecharía; y en el caso de los embriones, cuales transferiría,

congelaría y desecharía. Consideramos que existía acuerdo entre laboratorios cuando más del 75% adjudicaba la misma categoría a un embrión. Se consideró que existía acuerdo entre expertos cuando los cinco coincidían en la misma categoría para un embrión.

RESULTADOS:

Se observa un menor porcentaje de embriones con acuerdo entre los laboratorios cuando se decide Congelar (30.8%, 8/26) que al Transferir (42.9%, 18/42) o Desechar (66.7%, 18/27).

También se observa que el acuerdo entre laboratorios y expertos en la decisión

clínica presenta un índice kappa de 0.51 (IC: 0.36-0.66) y que existe menor acuerdo a la hora de Congelar un embrión (54.5%, 18/33) que al decidir Transferirlo (78.9%, 30/38) o Desecharlo (72.2%, 13/18).

Cuando no tenemos en cuenta los embriones que se deciden Transferir, los laboratorios deciden Congelar el 87.5% (21/24) de los embriones clasificados como Regular, mientras que los expertos el 100% (24/24). Además los expertos deciden Congelar más embriones Malos que los laboratorios (28.0% vs. 4.0%; 7/25 vs. 1/25) ($p < 0.05$).

CONCLUSIONES:

La decisión de congelar o no un embrión depende del observador.

No existe acuerdo entre laboratorios a la hora de decidir qué embriones congelar, y a su vez tampoco se ponen de acuerdo con los expertos que presentan mayor tendencia a congelar embriones que no transfieren. Esta diferencia nos llevaría a que las tasas de gestación por ciclo congelado serían porcentualmente mayores en el grupo de laboratorios que en el de expertos, pues los primeros congelan mejores embriones. Por esto creemos que la manera de evaluar un

programa de congelación embrionaria debería ser analizando la tasa de embarazos por ciclo con embriones frescos y congelados de manera conjunta.

También creemos que estas diferencias en la decisión de Congelar van a depender de la política de cada laboratorio que estará asociada a los resultados de sus técnicas de congelación/descongelación.

Creemos necesario establecer unas recomendaciones claras por parte de las Sociedades Científicas sobre que embriones deberían Congelarse y cuales no.

123: VALORACIÓN DE GESTACIONES GEMELARES MONOCIGÓTICAS TRAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

P. Torres, I. Peinado, M. De la Orden, M. Romeu, A. Monzó, JM Rubio, A. Pellícer.
Servicio Ginecología (Reproducción Asistida), Hospital Universitario La Fe, Valencia.

INTRODUCCIÓN:

Los riesgos patológicos tanto maternos como feto-neonatal de los embarazos múltiples han forzado a crear en la mayoría de los centros de reproducción asistida una política a favor de la transferencia de un máximo de 2 embriones. A pesar de seguir estas restricciones existe un riesgo potencial de gestación triple debido al desarrollo de gemelos monocigóticos (GMZ), que pueden derivar tanto de una división temprana del embrión como de una partición/ fragmentación de la masa celular interna del blastocisto. Se han descrito posibles factores in vitro que incrementan su aparición como la inducción a la ovulación, la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI), el cultivo secuencial (CS) y la eclosión asistida (EA).

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo en el que se incluye 3055 casos realizados con transferencia de 2 embriones en el Hospital Universitario La Fe de Valencia desde el 1/01/2006 hasta el

31/12/2008, quedando excluidos los ciclos de ovodon y criotransferencia. Al 27% de los casos se les realizó FIV clásica y al 73% restante ICSI. Otras técnicas como la EA y el CS se llevaron a cabo esporádicamente (0,59% y 0,56% respectivamente).

RESULTADOS:

Se obtuvo una tasa de gestación (latido cardiaco positivo) del 35%, tasa de implantación de 16% y tasa de niño en casa de 20%. De los 510 casos en los que se logró recién nacido vivo, el 28% resultó en gestación múltiple. En cuatro casos (1 de FIV y 3 de ICSI) se obtuvieron gestaciones triples tras la transferencia de sólo 2 embriones D+2 (tasa de GMZ = 0,42%). Las características morfológicas de los embriones transferidos en D+2 que dieron lugar a GMZ no muestran diferencias con los embriones implantados que desarrollaron un único feto. (Ver fotos)

CONCLUSIONES:

La tasa de gestación de GMZ referenciadas por algunos autores en la

bibliografía tras la realización de técnicas de reproducción asistida es de 0,95% (n=731), superior a la tasa obtenida en este estudio (0,42%). Sin embargo, ésta es comparable a la estimada en las gestaciones espontáneas (0,4%). A partir de estos datos se puede concluir que tanto la estimulación con gonadotropinas, como la ICSI, no influyen en la división intrauterina del embrión. Por el contrario, no se puede confirmar si técnicas como la EA y/o CS tienen relación con la aparición de GMZ.

124: ¿AFECTA EL IMC DE LA DONANTE A LOS RESULTADOS FIV/ICSI EN UN PROGRAMA DE DONACIÓN DE OVOCITOS?

A. Sánchez, D. Gumbao, J. Marcos, D. López, J. Landeras, B. Amorochó

IVI Murcia

INTRODUCCIÓN:

Diferentes estudios han analizado el Índice de masa corporal (IMC) de las receptoras de óvulos en un programa de Ovodonación. Styne-Gross A et al., en 2005 refiere que no existe ningún efecto negativo del elevado IMC de las receptoras en la receptividad endometrial y éxito reproductivo, mientras que los estudios publicados por Bellver et al., en 2007 revelan que el IMC interfiere en la receptividad uterina. Sin embargo, no existe en la actualidad, bibliografía de la influencia del IMC de las donantes en las tasas de gestación e implantación de sus receptoras.

Objetivos: Valorar si el IMC de la donante y receptora, afecta a los resultados FIV/ICSI en un programa de donación de ovocitos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo realizado en el IVI-Murcia, del 1 de Enero de 2007 al 31 de Diciembre de 2007.

El IMC fue calculado automáticamente usando el programa informático. La fórmula es peso (Kg)/altura (m²).

Los ciclos fueron divididos en grupos según el IMC: Menor de 20, entre 20-24.9, entre 25-29.9 y mayor o igual de 30. Se excluyeron ciclos de DGP y de mujeres mayores de 45 años.

Se estudiaron 205 ciclos: 30 corresponden a aspiraciones foliculares de donantes con IMC < 20. Otros 121 ciclos correspondieron a donantes con IMC entre 20-24.9. Otros 41 a donantes con IMC entre 25-29.9. Las 12 restantes aspiraciones foliculares pertenecen a IMC ≥ 30.

Los datos referentes al IMC de las receptoras de óvulos fueron los siguientes:

Receptoras con IMC menor de 20 con 7 ciclos, pacientes con IMC entre 20-24.9 con 114 ciclos, 42 ciclos de pacientes con IMC entre 25-29.9 y 23 pacientes correspondientes al grupo de IMC ≥ 30.

Se compraron tasas de gestación e implantación entre los diferentes grupos.

Los grupos fueron homogéneos en cuanto a edad y calidad embrionaria de las receptoras.

El análisis estadístico se realizó con el test de Chi cuadrado con valor significativo cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS:

Un total de 2189 ovocitos fueron inseminados. Las tasas de fecundación en los cuatro grupos fueron: 74%, 71%, 66% y 71% respectivamente con una media de 1.9 embriones transferidos en los cuatro grupos.

Las tasas de gestación por transferencia en los cuatro grupos fueron: 44%, 48%, 53% y 58% respectivamente.

Las receptoras con IMC entre 20-24.9 que reciben ovocitos de donantes con el mismo IMC tienen una tasa de gestación de 48.5% y una tasa de implantación de 31.2%

Las tasas de implantación fueron: 26.4%, 29.7%, 36.9% y 36.4% respectivamente.

En relación al IMC de las receptoras, en el grupo IMC ≤ 20, de los 7 casos se obtuvo un 33.3% de tasas de gestación y 28.5% en implantación. En el grupo de IMC entre 20-24.9 se valoraron 114 casos, con una tasa de gestación de 52.7% y 35% de implantación. En el grupo de IMC entre 25-29.9, con 42 casos, se obtuvieron tasas de gestación e implantación de 51.2% y 30.5%. El último grupo de receptoras con IMC ≥ 30

las tasas de gestación y de implantación fueron 40% y 21.6% respectivamente.

CONCLUSIONES:

Refiriéndose a las donantes, tanto en la tasa de gestación como en la de implantación no se observan diferencias estadísticamente significativas.

Respecto al grupo de las receptoras con un IMC entre 20-24.9, observamos una tendencia a una óptima receptividad uterina.

Consideramos que debemos continuar con el estudio a través del aumento del tamaño muestral para llegar a datos más concluyentes en cuanto a la selección de las donantes de óvulos y determinar si éste grupo son de mejor pronóstico reproductivo en un programa de donación de ovocitos.

125: LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL INTRAUTERINA COMO ALTERNATIVA A LA CANCELACIÓN POR BAJA RESPUESTA EN CICLOS DE FECUNDACIÓN IN VITRO

J. Massó¹, A. Busquets¹, L. Zamora¹, M. López-Teijón^{1, 2}, J. G. Álvarez^{1, 2}.

¹Institut Marquès; ²Fundación Leonardo Marquès, Barcelona

INTRODUCCIÓN:

La cancelación de un ciclo de fecundación in vitro (FIV) conlleva un elevado desgaste físico y psicológico para los pacientes, además del coste económico que supone. Cuando nos encontramos ante una baja respuesta a la estimulación ovárica, en lugar de optar por la cancelación del ciclo, podemos plantear continuar el ciclo y realizar inseminación artificial intrauterina (IA), una técnica sencilla y mínimamente invasiva.

MATERIAL Y MÉTODOS:

En este estudio retrospectivo (2007-2009) se evaluaron 41 ciclos de IA realizados tras la cancelación de un ciclo de FIV. En 30 ciclos se utilizó semen del cónyuge (IAC) y en 11 semen de banco (IAD). De acuerdo al protocolo utilizado en el Instituto Marquès para bajas respondedoras, el ciclo de FIV se cancela si hay menos de 3 folículos con un diámetro ≥ 14 mm tras 8-9 días con

gonadotropinas o después de 4 - 5 días de tratamiento adicional. Pacientes con factor tubárico bilateral o factor masculino severo fueron excluidas del estudio. Las muestras de semen se

en IAC y 438 pg/L en IAD, con una media de folículos ≥ 18 mm de 1.5 (0-4) y 1.4 (1-3) respectivamente. En la Tabla 1 se indican los resultados obtenidos en los ciclos de IAC e IAD.

	IAC	IAD
Nº Ciclos	30	11
Media de edad ♀	35,1 (29-43)	35,2 (27-40)
Tasa de embarazo/ciclo	26,7% (8/30)	27,3% (3/11)
Embarazo evolutivo	62,5% (5/8)	100% (3/3)
Embarazo ectópico	12,5% (1/8)	0%
Aborto espontáneo	12,5% (1/8)	0%
Embarazo bioquímico	12,5% (1/8)	0%

Tabla 1

procesaron mediante gradientes de densidad. La IA se llevó a cabo aproximadamente 40h post-hCG. Dos semanas después de la IA se realizó la prueba de embarazo en orina y la confirmación ecográfica del embarazo 10 días después.

RESULTADOS:

La media de estradiol el día de la administración de la hCG fue de 554 pg/L

CONCLUSIONES:

Los resultados de este estudio indican que la IA es una buena alternativa a la cancelación de ciclos de FIV por baja respuesta, aprovechando así el tratamiento hormonal al que ha sido sometida la paciente. Estos resultados preliminares deberán confirmarse en una serie más amplia de casos.

126: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LA CLASIFICACIÓN EMBRIONARIA DE ASEBIR Y NUESTRO SISTEMA DE CLASIFICACIÓN.

L. M. R. Menes, P. Duque, F. Graña, V. Sánchez, M. Vázquez, Y. Ruano, N. Fernández, P. Fernández. P. E. de la Fuente, C. García-Ochoa. CEFIVA (Centro de Fertilización in Vitro de Asturias). Oviedo. Gijón. ANACER (Asociación de Clínicas de Reproducción Asistida)

INTRODUCCIÓN:

En el año 2004 ASEBIR creó una comisión con el fin de unificar criterios de valoración embrionaria entre los centros de reproducción asistida de España. Para ello, ésta comisión se basó en una revisión bibliográfica, una encuesta multicéntrica y en la propia experiencia de los miembros de la comisión.

Se estableció una clasificación embrionaria en 4 categorías:

- Categoría A: embrión de óptima calidad con máxima capacidad de implantación.
- Categoría B: embrión de buena calidad con elevada capacidad de implantación.
- Categoría C: embrión con una probabilidad de implantación media.
- Categoría D: embrión de mala calidad con una probabilidad de implantación baja.

En CEFIVA desde el año 2003 clasificamos los embriones según criterios clásicos

con algunas variaciones, que nos permiten evaluar los embriones en diferentes categorías a partir de valoraciones morfológicas y cinéticas que observamos desde la fertilización hasta la transferencia embrionaria. Así clasificamos:

- Embrión tipo 1, 2a: embrión de buena calidad y buena capacidad implantadora.
- Embrión tipo 2b, 3: embrión con capacidad de implantación media.

-Embrión tipo 4, 5: embrión de mala calidad y baja capacidad implantadora.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se trata de un estudio prospectivo desde enero de 2008 hasta marzo de 2009, de embriones transferidos en ciclos de FIV/ICSI utilizando simultáneamente los 2 criterios de clasificación.

Para ello, seleccionamos transferencias en las que todos los embriones eran de calidad similar, bien sea según nuestra clasificación ó según los criterios de ASEBIR, observando que el resto de los parámetros fueron homogéneos en cuanto a indicación, edad, dificultad de la transferencia. El análisis estadístico utilizado fue la prueba de la Chi-cuadrado.

RESULTADOS:

Nuestra clasificación

Grupo de embriones	Transferencias	Embriones transferidos	Gestaciones	Sacos	Nº:embr/transf	Gest/transf	Tasa de implantación
Buenos A,B	260	499	105	139	1,92	40,38% **	27,85% **
Malos C,D	109	194	21	24	1,78	19,26%	12,37%
TOTAL	369	693	126	163	1,88	34,1%	23,52%

Grupo de embriones	Transferencias	Embriones transferidos	Gestaciones	Sacos	Nº:embr/transf	Gest/transf	Tasa de implantación
Buenos 1,2a	263	503	102	133	1,9	37,78%**	26,44%**
Malos 2b, 3,4,5	109	196	24	27	1,79	22,01%	13,77%
TOTAL	372	699	126	160	1,87	33,87%	22,88%

Clasificación ASEBIR

** $p < 0,01$

En la siguiente tabla se detalla un grupo de transferencias del total, en las que la calidad embrionaria difería de una clasificación embrionaria a otra.

Cambio de clasificación de la nuestra a la de ASEBIR:

CONCLUSIONES:

Grupo de embriones	Transferencias	Embriones transferidos	Gestaciones	Sacos	Embr/transf	Gest/transf	Tasa de implantación
Buenos malos	10	15	0	0	1,5	0	0
Malos buenos	15	27	4	5	1,8	26,66%	18,51%
TOTAL	25	42	4	5	1,68	16%	11,94%

A la vista de éstos resultados podemos concluir que no existen grandes diferencias entre una clasificación y otra. Ambas distinguen bien entre embriones de buena y mala calidad, pero al comparar los casos en los que hay discrepancias entre ambas clasificaciones, parece discriminar mejor la calidad embrionaria la clasificación de ASEBIR, por lo que tras estos resultados, debe de ser éste nuestro criterio a la hora de la selección embrionaria.

BIBLIOGRAFÍA:

Cuadernos de embriología clínica. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos (II edición).

127: COMPARATIVA DE LAS TASAS DE EMBARAZO EN LOS CICLOS EN LOS QUE SE TRANSFIEREN EMBRIONES CON BLASTÓMERAS BINUCLEADAS EN FUNCIÓN DEL DÍA DE LA TRANSFERENCIA.

J. Cuadros, L. Andrés Criado, M. Sánchez de Burgos, M. Nieto Sánchez, E. Hernández
Clínica FivMadrid, Madrid

INTRODUCCIÓN:

En la última década, diversos estudios han demostrado que los ciclos de FIV-ICSI en los que se transfieren embriones con blastómeras multinucleadas tienen tasas de embarazo y de implantación significativamente inferiores que las de los ciclos donde se transfieren embriones sin blastómeras multinucleadas. Sin embargo, la complejidad del tema, sobre todo en relación con la presencia de una o más de una célula multinucleada, de si la

multinucleación aparece en d+2 o en d+3, o de si la célula multinucleada tiene 2 o más de 2 núcleos, hace necesario abordar este parámetro diferenciando entre estas posibilidades, para distinguir el potencial de implantación de los diferentes embriones multinucleados. En este estudio, comparamos las tasas de implantación de los embriones que presentan una blastómera binucleada en d+2 vs los embriones que presentan una blastómera binucleada en d+3.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se analizaron retrospectivamente 111 embriones transferidos en ciclos de FIV-ICSI que presentaban sólo una blastómera binucleada, y en los que se demostró 0-100% de implantación. 68 de estos embriones fueron transferidos en d+2 y 43 fueron transferidos en d+3.

RESULTADOS:

En el grupo de transferencias en d+2, de los 68 embriones binucleados

transferidos, 8 dieron lugar a la formación de un saco gestacional (11,8% de tasa de implantación). En el grupo de transferencias en d+3, de los 43 embriones binucleados transferidos, 8 originaron un saco gestacional (18,6% de tasa de implantación). El análisis estadístico mediante chi-cuadrado mostró que la diferencia entre las tasas

de implantación en d+2 y en d+3 no es estadísticamente significativa.

CONCLUSIONES:

En este estudio, la tasa de implantación de los embriones que presentan sólo una blastómera binucleada en d+2 es más baja que la encontrada en los embriones

con sólo una blastómera binucleada en d+3. Sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa, con lo cual, probablemente, el compromiso del potencial de implantación por la binucleación afecte de manera similar tanto en d+2 como en d+3.

128: A DEBATE COOK® VS MEDICULT®: CALIDAD EMBRIONARIA Y TASA DE GESTACIÓN.

I. Peinado, P. Torres, M. De la Orden, T. García-Gimeno, V. Montañana, JM. Rubio y A. Pellicer
Servicio Ginecología (Reproducción Asistida), Hospital Universitario La Fe, Valencia.

INTRODUCCIÓN:

Los medios de cultivo embrionario reproducen las necesidades fisiológicas de los embriones en cada etapa de su desarrollo mediante el aporte de nutrientes, oligoelementos y hormonas. Es continúa la investigación acerca de la formulación ideal de dichos medios, ya que pequeñas diferencias en la composición, molaridad, pH, etc. de los mismos puede influir en la calidad y supervivencia embrionaria y por tanto, variar significativamente el resultado de un ciclo de Fecundación In Vitro.

El presente trabajo plantea como objetivo la comparación de dos medios de cultivo embrionarios complejos que presentan dos casas comerciales diferentes: Medicult® y Cook®. Valorando el resultado mediante la calidad embrionaria, tasa de gestación, implantación y aborto.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio prospectivo que incluye 70 pacientes a las que se les realizó un ciclo FIV/ICSI del 22 de Octubre al 5 de Noviembre del año 2008 en el Hospital Universitario La Fe de Valencia. La selección de las pacientes en cada grupo de estudio estuvo condicionada por la disponibilidad de los medios de cultivo utilizados en el trabajo, así se asignó 6 días consecutivos para la utilización de los medios del grupo experimental (Cook® n=32) y 4/3 días

antero/posteriores para el grupo control (Medicult® n=38). Los parámetros recogidos en el estudio son: características físicas de las pacientes, parámetros básicos de la estimulación, calidad embrionaria y resultado de los ciclos. La valoración morfométrica de los embriones se efectuó con el programa de análisis de imagen CRONUS 3.1., mientras que el análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa SPSS 15.0.

RESULTADOS:

Se observa homogeneidad de los grupos con respecto al diagnóstico de esterilidad de cada uno de los miembros de la pareja, índice de masa corporal y edad de las mujeres que participan en el estudio, días de estimulación, grosor del endometrio y estradiol el día de hCG, recuento de espermatozoides móviles (REM), nº folículos puncionados, ovocitos recuperados, técnica empleada (FIV/ICSI) y embriones transferidos.

Los resultados no muestran diferencias significativas en relación a la Tasa de gestación (TG: 40% vs 46%; p-valor = 0.408), Tasa de Implantación (TI: 26% vs 39%; p-valor = 0.072) y Tasa de aborto (TQ: 19% vs 20%; p-valor = 0.641). No obstante, se obtienen diferencias significativas a favor de los medios de Cook® si comparamos la Calidad de los embriones transferidos (clasificación recomendada por ASEBIR (p-valor = 0.015)). El análisis estadístico de los

datos morfométricos obtenidos mediante el CRONUS®, señala igualdad en el número de células de los embriones de ambos grupos, pero mayor área, perímetro y nº de fragmentos en los embriones cultivados con Medicult® vs Cook®, llegando esta última diferencia a ser significativa (p-valor = 0.015).

CONCLUSIONES:

La variabilidad en la TG y TI según el medio de cultivo utilizado está extensamente referenciado y los resultados varían según el laboratorio donde se efectúe el estudio. En el presente trabajo la utilización de los medios de Cook® presenta de forma significativa: una mejor calidad embrionaria y una mayor tasa de gestaciones múltiples, sin embargo, esta diferencia no alcanza la significación estadística en lo que concierne a la Tasa de Gestación. Probablemente el aumento del tamaño muestral aclararía estas diferencias encontradas.

129: VALORACIÓN DE LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA MEDIANTE MICROSCOPIA DE ALTA MAGNIFICACIÓN

G. López, R. Lafuente, O. Cairó, S. Rovira, M. Brassesco
CIRH Clínica Corachan, Barcelona

INTRODUCCIÓN:

Comparar los resultados obtenidos en la evaluación de la morfología espermática mediante la técnica tradicional de tinción Diff-Quik y la microscopía de alta magnificación.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Material y Métodos: En estudio prospectivo, se analizaron 45 muestras mediante dos métodos distintos: Diff-Quik y Alta Magnificación.

Se evaluó el porcentaje de espermatozoides normales, en muestras teñidas y fijadas según técnica Diff-Quik, siguiendo el criterio estricto de Kruguer (400x). Los resultados se compararon con los obtenidos tras determinar las características morfológicas de la cabeza del espermatozoide mediante microscopía de alta magnificación (Leica

AM6000) a 8000x.

Se contaron un total de 100 espermatozoides por muestra. Se realizó análisis estadístico mediante programa PASW Statistics 17.0.

RESULTADOS:

Se dividieron las muestras en dos grupos de comparación:

I) Muestras con morfología normal (>15% de espermatozoides normales según la OMS) (n=6):

- Media formas normales mediante alta magnificación: 9.8%

- Media formas normales mediante Diff-Quik: 20.6%

II) Muestras teratozoospermicas (<15% espermatozoides con forma normal) (n=39):

- Media formas normales mediante alta magnificación: 4.1%

- Media formas normales mediante Diff-Quik: 9.4%

En ambos grupos el porcentaje de espermatozoides con formas normales fue significativamente menor (p=0.05) cuando se realizó el contaje mediante microscopía de alta magnificación (AM).

CONCLUSIONES:

La aplicación de la microscopía de alta magnificación a 8000x para el análisis de la morfología espermática es mucho más precisa que el método tradicional Diff-Quik. Además, la alta magnificación es una técnica que permite realizar el contaje in vivo, no afectando la viabilidad espermática y permitiendo la selección para técnicas in vitro.

130: RELACIÓN ENTRE LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA Y ABORTOS EN EL PRIMER TRIMESTRE

I. Moragues Espinosa de los Monteros, A Brotons, A. Fernández-Peinado
Clínica In Vitam Centro de Medicina Reproductiva, Elche

INTRODUCCIÓN:

Sabemos que la morfología espermática influye directamente en la calidad embrionaria, y que ésta a su vez se relaciona con una gran cantidad de casos de abortos de repetición.

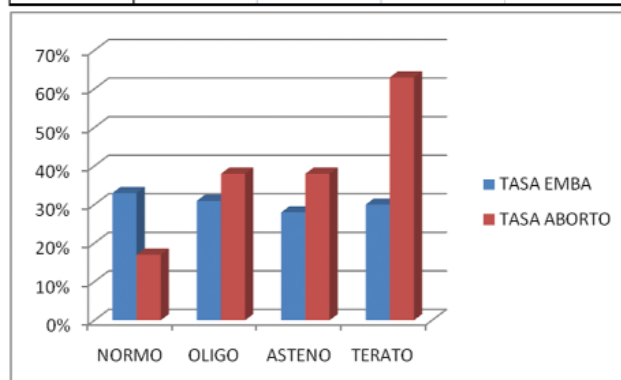
OBJETIVOS:

Relacionar la morfología espermática con abortos en el primer trimestre, en pacientes sometidos a ciclos de Inseminación Artificial.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Analizamos todos los pacientes de

	NORMO	OLIGO	ASTENO	TERATO
NÚMERO	69	26	29	27
EMBARAZO	23	8	8	8
TASA EMBA	33%	31%	28%	30%
ABORTOS	4	3	3	5
TASA ABORTO	17%	38%	38%	63%



Inseminación Artificial, y los separamos según Diagnóstico Seminal, en Normozoospermicos (n=65), Oligozoospermicos (n=26), Astenoospermicos (n=29), y Teratoospermicos (n=27). Hacemos todo el seguimiento desde la Inseminación hasta el final del embarazo.

RESULTADOS:

Ver tabla y gráfico

CONCLUSIONES:

Observamos que en todos los grupo encontramos casos de abortos en el

primer trimestre, sin embargo, el número de casos aumenta en el grupo con Teratozoospermia.

131: MEJORA DE RESULTADOS EN FIV OPTIMIZANDO LA CALIDAD DE LABORATORIO

C. Muñoz, M. Gago, S. Cortes, A. García, M. Reguera, C. Luna, R. Núñez, P. Caballero
Clínica Tambre, Madrid

INTRODUCCIÓN:

El Modelo de Excelencia EFQM propone como objetivo mejorar cualquier aspecto de un servicio sanitario, para ello requiere el examen continuo de todos los componentes del sistema de organización, aplicable en Laboratorios de Reproducción Asistida.

En este informe presentamos la experiencia de un laboratorio acreditado, antes y después, de las mejoras propuestas por el Modelo de Excelencia EFQM.

El objetivo de este estudio es comparar los resultados obtenidos en el laboratorio de FIV, antes y después de una auditoría externa llevada a cabo en 2006.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Durante la visita, el consultor realizó las siguientes actividades:

Observación detallada de los procesos del laboratorio, incluyendo todo tipo de procedimientos, así como otras actividades de laboratorio.

Presentación al equipo de Laboratorio de los siguientes temas: El carácter general de los sistemas de acreditación de laboratorio, formación básica en sistemas de análisis, y en su diseño y aplicación; los procesos básicos en la gestión de la calidad, incluyendo control de la calidad, garantía de la calidad y mejora de la calidad ("Ciclo de

Calidad"); la evaluación comparativa, indicadores y control de procesos; solución de problemas (identificando la raíz del problema); los fundamentos de la gestión de riesgos (incluyendo el uso de modelos fallidos y el análisis de esos efectos); y el control de documentos.

El auditor en su revisión de las operaciones como parte del programa del Modelo de Excelencia EFQM, realizó 92 recomendaciones: 23 relacionadas con el manejo y funcionamiento, 48 relacionadas con procesos técnicos, 15 con procesos de organización clínica, y 6 relacionadas con recursos humanos.

Tras la auditoría, los principales cambios que se realizaron en el Laboratorio de FIV se resumen así:

Sistema de alarmas para informar al personal adecuado de cualquier problema con cualquier equipo fuera del horario de trabajo. El equipo que debe ser controlado incluye el suministro de gas, todos los incubadores con cultivos de ovocitos y embriones, y todos los criobancos utilizados en almacenamiento de gametos y embriones.

Se ha sustituido el uso de PBS como medio en la captación de ovocitos por un medio sin fosfato, que puede dañar los mismos.

En la captación ovocitaria se utilizan termopares y un termómetro electrónico para investigar los cambios de temperatura experimentados por el folículo durante el proceso.

Un incubador situado en la sala adyacente a la bomba de aspiración, para mantener el suficiente número de tubos precalentados, estará disponible con un dispositivo para mantener los tubos calientes mientras se llenan.

El estudio se basó en la recuperación ovocitaria durante el período 2006-2008. Los resultados obtenidos en 2007 (n=935) y 2008 (n=1056) se compararon con los obtenidos en 2006 (n=906), utilizando el test de chi-cuadrado. Los primeros resultados fueron embarazo clínico, definido por al menos un latido fetal. También comparamos la tasa de utilización de embriones.

RESULTADOS:

La tasa de embarazo clínico aumentó significativamente hasta 49,8% y 48% en el estudio de cohortes comparado con el cohorte control histórico (30%). (p<0,01).

CONCLUSIONES:

La implantación y el trabajo basado en un sistema de control de calidad acreditado en unidades de Reproducción Asistida es un trabajo sin fin, y es un sistema que ha mejorado el ambiente en el que los gametos y embriones de pacientes son manipulados. Estos datos apoyan la hipótesis de que el uso de un sistema de calidad, puede, como en este caso, tener repercusiones positivas en la tasa de embarazo.

132: EFICACIA Y BIOSEGURIDAD EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS: COMPARACIÓN DE CRIOPROTECTORES COMERCIALES CON DIFERENTES FUENTES PROTEICAS.

M. C. Fuentes¹, J. Alfonso², C. C. Duque³, I. Navarro^{1, 2}, A. Monzó^{1, 2, 3}, V. Montañana^{1, 2, 3}.

¹Fundación IMER de la Comunidad Valenciana. ²Instituto de Medicina Reproductiva (IMER) Valencia.

³Unidad de Reproducción Asistida, Hospital Universitario La Fe, Valencia.

INTRODUCCIÓN:

La criopreservación de semen es una práctica clínica habitual en los centros de reproducción asistida. Sus indicaciones más frecuentes son conservar las muestras durante un periodo ventana de conversión en determinadas infecciones víricas de acuerdo con el RD 412/1996 de donantes de semen con fines reproductivos, preservación de muestras "valiosas", conservación previa a quimioterapia/radioterapia, vasectomía o condicionantes personales.

Tras una exposición gradual a los crioprotectores (fase de adición), se somete a las células a curvas de enfriamiento hasta alcanzar temperaturas de -196° C. Tras su almacenamiento, se procede a la descongelación, para lo que hay que eliminar totalmente los crioprotectores (fase de dilución), hasta el retorno a condiciones isosmóticas para la célula.

En procesos de manipulación de tejidos y células humanas, la utilización de componentes de origen animal o humano es controvertido, tal y como propone la F.D.A. (Food and Drug Administration) tendiendo al uso de productos de origen recombinante o en su defecto altamente purificados, para minimizar o suprimir el riesgo de contaminaciones a partir de estos.

El objetivo de este estudio es comparar la eficacia y la bioseguridad en la criopreservación de muestras de semen de tres crioprotectores comerciales con diferente composición (Freezing Medium-Test Yolk Buffer (TYB) with Glycerol and Gentamicin (IrvineScientific): glicerol + yema de huevo + Tris-TES; Sperm Freezing Medium (Medicult): glicerol + sacarosa + hSA; Sperm Cryo Protec II™; (Nidacon):

glicerol + hSA), para poder seleccionar aquel que mejor se adecue a la práctica clínica, teniendo en cuenta tanto la bioseguridad, la eficacia y el coste generado.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se analizaron un total de 23 muestras de semen procedentes de estudios diagnósticos, tanto de parejas incluidas en el programa de reproducción asistida (n = 14; 9 normozoospermicas, 1 oligozoospermicas, 4 astenozoospermicas), como de donantes (n = 9) del banco de semen del Instituto de Medicina Reproductiva (IMER), Valencia. Cada muestra se dividió en tres alícuotas, criopreservando cada una de ellas con un crioprotector distinto. Las muestras permanecieron almacenadas un mínimo de 48h, tras las que se procedió a su descongelación, dilución del crioprotector y recuperación de las condiciones isosmóticas. Se valoró el recuento y motilidad espermática, viabilidad, test de capacitación (REM) y supervivencia a las 24h. Tras el análisis las muestras fueron desechadas.

RESULTADOS:

Las muestras seminales de cónyuge criopreservadas no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) para la viabilidad espermática, recuento y motilidad en condiciones isosmóticas, REM y supervivencia a las 24h, para los crioprotectores ensayados. En el caso de las muestras de donante, tampoco se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) para los parámetros analizados entre los tres crioprotectores estudiados. Bajo nuestras condiciones de trabajo, Sperm Cryo Protec II™ (Nidacon) resultó ser el crioprotector más eficiente debido a su bajo coste y a la dilución utilizada (1:3), a pesar de ser

el protocolo más largo (90min).

CONCLUSIONES:

La ausencia de diferencias estadísticas que permitan la discriminación entre crioprotectores en base a los parámetros analizados, hace que, para la elección del crioprotector debamos basarnos en criterios como el coste por muestra criopreservada (precio del crioprotector y tiempo empleado), o el protocolo que mejor se adapte a la rutina del nuestro laboratorio (almacenamiento, caducidad, tipo de presentación, etc.)

133: EVOLUCIÓN DE EMBRIONES EN OBSERVACIÓN EN CULTIVO PROLONGADO EN FUNCIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN Y NÚMERO DE CÉLULAS

D. López, B. Amorocho, D. Gumbao, P. Albero, L. Fernández, M. Nicolas, J. Landeras.
IVI Murcia

INTRODUCCIÓN:

Los fragmentos son componentes de citoplasma rodeados de membrana citoplasmática que no contienen material nuclear (ADN). Alíkani, et al., 1999. Suelen producirse entre el estado de cigoto y en las siguientes divisiones embrionarias.

Las causas pueden ser debido a Factores externos como condiciones de cultivo, estimulación ovárica. Factores internos como la integridad genética, desequilibrio cromosómico, alteraciones de la cariocinesis y citocinesis (Juriscova A, et al., 1996)

Objetivos: Determinar la evolución embrionaria, tasa de congelación, descongelación, supervivencia y gestación de acuerdo al grado de fragmentación embrionaria en día 3 hasta blastocisto

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se llevó a cabo un análisis retrospectivo de 810 ciclos del laboratorio de fecundación in vitro del IVI Murcia con embriones en observación entre enero de 2002 y diciembre de 2008. La media de edad de las pacientes fue de 35 años \pm 2.0. Se excluyó del estudio a las pacientes del programa de ovodonación.

1968 embriones fueron observados y cultivados hasta el día cinco de desarrollo en un medio secuencial (Vitrolife), y se les dividió posteriormente en dos grupos: el Grupo A - con una tasa de fragmentación de $<20\%$ - y el Grupo B - con una tasa de fragmentación entre 20-40%. A continuación, cada grupo se dividió en diez subgrupos adicionales según el número de células presentes en día tres de desarrollo. Los embriones que en estado de blastocisto cumplieron las características adecuadas fueron criopreservados por el método de congelación lenta (Cook).

RESULTADOS:

La tasa global de congelación fue del 17,37%. La tasa de evolución hasta blastocisto fue similar en el subgrupo de embriones de ocho células en ambos grupos, siendo del 24,4% en el Grupo A y del 27,8% en el Grupo B. La tasa de gestación en el Grupo A fue del 38,6% y del 30% en el Grupo B. La tasa de aborto en el Grupo A fue del 36,4% y del 46,7% en el Grupo B.

CONCLUSIONES:

Con este estudio podemos concluir que si un blastocisto cumple los criterios de congelación, la tasa de supervivencia es independiente del porcentaje de fragmentación en D3 y del número de células. Pocos embriones observados son finalmente congelados y sus tasas de supervivencia y gestación son comparables a las de los embriones no observados pero dan lugar a tasas más altas de aborto.

134: ¿INFLUYE EL TIEMPO TRANSCURRIDO ENTRE LA ENTREGA DE LA MUESTRA Y EL MOMENTO DE LA INSEMINACIÓN?

M. Lierta, C. Romeu y A. Urries.
Reproducción Asistida Quirón Zaragoza, Grupo Hospitalario Quirón.

INTRODUCCIÓN:

Con el fin de optimizar el trabajo y los recursos de nuestro laboratorio, se unificaron las horas de recepción de las muestras de semen de las parejas sometidas a ciclos de Inseminación Artificial Conyugal (IAC). El objetivo de este estudio es determinar si afecta en las tasas de gestación el tiempo transcurrido desde la entrega hasta el momento de la inseminación en los resultados del centro.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo de 207 ciclos, realizados en los últimos 6 meses. El análisis se ha llevado a cabo en parejas en las que la mujer presentaba una edad ≤ 38 años, y sin causa aparente de esterilidad. Los varones mostraban un recuento de espermatozoides móviles totales (REMT) ≥ 5 mill (valores recomendados por la OMS para la realización de IAC), y en función de su calidad seminal se estructuraron en 3 grupos:

Grupo I: Varones con un REMT comprendido entre 5 – 10 mill.

Grupo II: Varones con un REMT comprendido entre 10-20 mill.

Grupo III: Varones con un REMT superior a 20 mill.

Se ha realizado análisis estadístico utilizando ANOVA, $P < 0.05$ y t – Student, $P < 0.05$.

Los resultados se han analizado en base al tiempo transcurrido entre la entrega de la muestra y el momento de la inseminación.

RESULTADOS:

(REMT/T.T)	1h	2h	3h	4h	5h	6h
5\10	50%	60%	100%	25%	0%	-
10\20	-	0%	100%	0%	0%	-
>20	0%	27%	0%	6%	14%	0%
TOTAL	25%	28%	33,3%	10%	10%	0%

Tabla I. Porcentaje de gestación según el tiempo transcurrido entre la entrega de la muestra y la inseminación
 REMT= Recuento de espermatozoides móviles totales (mill)
 T.T.= Tiempo transcurrido (h)

(REMT/T.T)	1h	2h	3h	TOTAL
5\10	50%	60%	100%	62,5% *
10\20	-	0%	100%	37,5%
>20	0%	27%	0%	16% *

Tabla II. Porcentaje de gestación en función de la calidad espermática
 REMT= Recuento de espermatozoides móviles totales (mill)
 T.T.= Tiempo transcurrido (h)
 * P < 0.05

CONCLUSIONES:

Los mejores resultados se han obtenido cuando no han transcurrido más de 3 horas entre la entrega de la muestra seminal y la inseminación intrauterina,

ya que el 80% de los embarazos obtenidos se realizaron durante este periodo de tiempo. A partir de la tercera hora las tasas de gestación descienden considerablemente (Tabla I). Teniendo en cuenta estos resultados, como dato añadido, hemos realizado un segundo análisis en el que se ha estudiado la tasa de gestación dentro del periodo de las tres primeras horas en función de la calidad espermática del varón, hallando diferencias significativamente estadísticas entre muestras con un REMT de 5-10mill y las que presentaban más de 20mill (Tabla II). En consecuencia, se consiguen mejores resultados cuando la IAC está indicada por un claro factor masculino frente a Esterilidades Sin Causa (ESCA).

135: EVALUACIÓN DE LA TASA DE GESTACIÓN DE INSEMINACIONES ARTIFICIALES EN FUNCIÓN DEL NÚMERO DE FOLÍCULOS CON ESTIMULACIÓN OVÁRICA (IVI-VIGO).

D. Pabón, M. Martínez, N. Torres, S. Portela, E. Muñoz.
 IVI, Vigo

INTRODUCCIÓN:

El Desarrollo Folicular Múltiple (DFM) ha demostrado influir favorablemente en el aumento de las tasas de gestación en tratamientos de inseminación artificial, no obstante con la estimulación ovárica se aumenta el riesgo de obtener gestaciones múltiples, además de las complicaciones adicionales que esto conlleva. Gran parte de los estudios (Verhulst et al, 2006; Rumste Van et al., 2008) encuentran una relación positiva ente el desarrollo folicular y las tasas de embarazo, sin embargo el DFM sigue siendo polémico en tratamientos de inseminación artificial.

OBJETIVO:

El propósito de este trabajo es evaluar nuestros resultados en tratamientos de

inseminaciones artificiales, teniendo en cuenta la tasa de gestación en función del número de folículos desarrollados.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Se realiza un análisis retrospectivo, donde se incluyen desde 01/01/2006 Hasta el 31/12/2008, 285 Inseminaciones artificiales, tanto homólogas (IAH) como de donante (IAD). Se evalúa la tasa de gestación con respecto al número de folículos mayores o iguales a 17mm desarrollados con la estimulación.

RESULTADOS:

La tasa de embarazo total es del 23,85%. La tasa de embarazo en ciclos con crecimiento monofolicular fue del: 19,66 % y las tasas gestacionales para 2 y 3

folículos mayores o iguales a 17mm fue respectivamente del 30,5% y 31,8%. La tasa de embarazo aumentó al fomentar el crecimiento folicular de por lo menos 2 folículos y el riesgo de embarazo múltiple aumentó de acuerdo al desarrollo multifolicular en 7,69% para 2 folículos y 14,28% para 3 folículos, mientras que en el desarrollo monofolicular la tasa de gestación múltiple fue de 2,86%.

CONCLUSIONES:

El desarrollo folicular múltiple mejora la tasa de gestación comparado con el desarrollo monofolicular en inseminaciones intrauterinas. Las tasas de embarazo se mejoran cuando se desarrollan 2 folículos ≥17mm y se recomienda no superarlos para prevenir el aumento de gestaciones múltiples.

136: ¿CUÁNDO OCURRE LA MAYOR VARIABILIDAD ENTRE LABORATORIOS EN LA EVALUACIÓN EMBRIONARIA?

R. Ruiz de Assin, J. Fontes, M. C. Gonzalvo, A. Fernández, M. Roldán, B. Rabelo, R. P. Cotarelo, J. A. Castilla.

U. Reproducción Hospital Virgen de las Nieves, Granada

INTRODUCCIÓN:

La existencia de variaciones interobservador es un hecho constatado en diferentes campos de la ciencia, en el campo de la embriología también encontramos este fenómeno. La participación en programas de control de calidad externo, la adecuada formación de los miembros de un mismo equipo y las reuniones de consenso pueden disminuir estas diferencias.

OBJETIVO:

El objetivo de este estudio es ver cuándo se observa una mayor variabilidad entre laboratorios, no sólo a la hora de clasificar un embrión, sino también al decidir su destino.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Todos los datos utilizados para el análisis fueron obtenidos del programa español de control de calidad externo para el laboratorio de reproducción, programa auspiciado por Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR), con más de 40

laboratorios de toda España participando en el programa entre 2003 y 2007. Consistente en el envío de DVD/CD-ROM, con videos de Cigotos y embriones en Día 2 y Día 3, cada envío estaba dividido en 5 punciones con 5 embriones cada uno; una punción en estadio de Cigoto, 2 punciones en Día 2 y 2 punciones en Día 3. Se debía clasificar cada embrión como Bueno, Regular o Malo y decidir de cada punción qué dos embriones se transferirían, y de los no transferidos, cuales se congelarían y cuales se desecharían. Se consideró que existía alto grado de acuerdo en clasificación cuando más del 75% de los laboratorios adjudicaban la misma categoría para un mismo embrión. Se consideró que existía alto grado de acuerdo en decisión clínica cuando más del 75% de los laboratorios coincidían en la decisión clínica para un mismo embrión.

RESULTADOS:

Observamos un mayor porcentaje de embriones con alto grado de acuerdo cuando la evaluación se realiza sobre embriones de Día 3 (58.0%, 29/50) que

cuando se evalúan embriones de Día 2 (32.0%, 16/50) ($p < 0.05$) o Cigotos (40.0%, 8/20).

También observamos un mayor porcentaje de embriones con alto grado de acuerdo cuando la categoría más escogida fue Mala (72.4%, 21/29) calidad, que cuando la categoría más escogida fue Regular (28.6%, 12/42) ($p < 0.05$) o Buena (41.4%, 12/29) ($p < 0.05$).

El porcentaje de embriones en el que se obtuvo un alto grado de acuerdo fue mayor cuando la decisión clínica más escogida para un embrión fue Desechar (66.7%, 18/27) que a la hora de Congelar (30.8%, 8/26) ($p < 0.05$) o Transferir (42.9%, 18/42).

CONCLUSIONES:

La mayor variabilidad entre laboratorios se produce a la hora de evaluar embriones en Día 2; cuando se clasifica como Regular o Malo; y cuando se decide Congelar.

137: INFLUENCIA DEL TIEMPO DE PERMANENCIA EN EMBRYOGLUE SOBRE LAS TASAS DE GESTACIÓN EN EL CERHA DE BADAJOZ

F. Monllor, A. Ortiz, G. Lozano, I. M. Baena, M. I. Jiménez.

Centro Extremeño De Reproducción Humana Asistida (CERHA). Hospital Materno Infantil. Badajoz

INTRODUCCIÓN:

Siguiendo la tendencia de implantar programas de control y sistemas de calidad en el laboratorio de reproducción asistida, los embriólogos del Centro Extremeño de Reproducción Asistida diseñamos los protocolos de trabajo con la ayuda de las guías de práctica clínica y las instrucciones de uso proporcionadas por las casas

comerciales para los medios de cultivo. Para la elaboración del protocolo de transferencia embrionaria (TE), realizamos un estudio analizando el tiempo que los embriones permanecían en el medio de transferencia (Embryoglué, Vitrolife). La casa comercial recomienda un intervalo entre 10 y 30 minutos pero es difícil respetar ese intervalo debido a varios factores tales como descoordinación con el

ginecólogo, pacientes que no están preparadas en el último momento, etc....

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se han incluido 100 TE al azar, realizadas entre Enero y Marzo de 2009, a parejas que acuden al centro por problemas de reproducción. La edad de la mujer está comprendida entre 25 y 40 años. En un

9% de los casos se utilizó semen de donante y en un 8% se realizó un ciclo mixto; el resto de TE correspondían a ciclos conyugales de ICSI. El 42% de las TE se realizaron en D+2 y el 58% restante en D+3. El tiempo de permanencia en Embryoglué se cronometró desde el momento de pasar los embriones a este medio, hasta el momento de pulsar el émbolo para descargarlos en el útero.

RESULTADOS:

		Entre 0 y 10 minutos	Entre 11 y 30 minutos	Mayor de 30 minutos
Gestación β	Negativa	10 52,6%	18 43,9%	21 52,5%
	Positiva	9 47,4%	23 56,1%	19 47,5%
Total		19	41	40

*el tiempo máximo de permanencia en Embryoglué es de 88 minutos.

No se observan diferencias significativas entre el intervalo recomendado (10-30 minutos) y el que sobrepasa este intervalo ($p=0,697$); si bien, intentamos ajustarnos al protocolo de Embryoglué y por eso el tiempo de permanencia máximo en este medio ha sido de 1 hora y 28 minutos. Para el intervalo por debajo de los

10 minutos tampoco encontramos diferencias.

CONCLUSIONES:

El intervalo de permanencia de los embriones en Embryoglué recomendado por Vitrolife (10-30 min.) nos parece demasiado estricto dado que el no cumplimiento de este periodo de tiempo no afecta a nuestros resultados. Por tanto, el cambio de los embriones a este medio puede realizarse cuando sea mejor para la organización del trabajo en el laboratorio, aunque la casa comercial aconseja no sobrepasar las 3 horas.

138: TASAS DE EMBARAZO EN LOS CICLOS DE DESCONGELACIÓN VERSUS DESVITRIFICACIÓN

M. Sánchez de Burgos, M. Nieto Sánchez, L. Andrés Criado, J. Cuadros, E. Hernández
Clínica FivMadrid

INTRODUCCIÓN:

En un estudio paralelo a éste, llevado a cabo en nuestro centro, hemos comprobado que aquellos embriones que proceden de ciclos de desvitrificación presentan mayores tasas de supervivencia embrionaria que los que proceden de la descongelación tradicional. (90,5% vs. 62,8%). Esto sugeriría la posibilidad de que los embriones desvitrificados podrían dar lugar a mayores tasas de embarazo e implantación. El objetivo de este estudio es comparar las tasas de embarazo, implantación y de abortos en los ciclos de descongelación tradicional vs los ciclos de desvitrificación.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se realizó un estudio prospectivo y randomizado desde Diciembre de 2008 hasta Marzo de 2009. La técnica de congelación en cada paciente se hizo de forma aleatoria mediante el programa Research Randomizer Form v4.0.

Se llevaron a cabo un total de 65

descongelaciones vs 24 desvitrificaciones.

RESULTADOS:

	Nº ciclos	IICG+	Emb. Clínico	Tasa implantación	Abortos
Descongelación	65	31,3% (20/64)	26,6% (17/64)	14,2% (22/155)	17,6% (3/17)
Desvitrificación	24	33,3% (8/24)	25,0% (6/24)	19,6% (10/51)	0%

Los resultados obtenidos fueron similares con ambas técnicas, tanto en las tasas de hCG+, como en las de embarazo clínico. La tasa de implantación fue algo superior en aquellas pacientes en las que se transfirieron embriones procedentes de la desvitrificación, sin embargo el análisis estadístico mediante chi-cuadrado no mostró diferencias significativas. Hasta la fecha, no se han producido abortos en las gestaciones obtenidas con los embriones desvitrificados.

CONCLUSIONES:

El presente estudio muestra que la

probabilidad de embarazo y la tasa de implantación embrionaria son estadísticamente similares si comparamos la descongelación

tradicional con la desvitrificación, aunque de momento no se han producido abortos con los embriones desvitrificados. Consideramos necesario continuar con este estudio, y reevaluarlo con un número mayor de casos.

139: EFECTO DE LA DECUMULACIÓN TOTAL O PARCIAL DEL COMPLEJO CÚMULO-OVOCITO SOBRE LA TASA DE EMBARAZO

M. I. Rubio Palacios, L. Mifsud Elena, J. Iñíguez Tornero, I. Cuevas Sáiz.
Hospital General Universitario de Valencia

INTRODUCCIÓN:

durante la foliculogénesis las células de la granulosa (CGs) son esenciales para la maduración del ovocito y la adquisición gradual de su competencia. Así mismo, las células del cúmulo (CCs) deben secretar factores de crecimiento paracrinos o expresar moléculas de adhesión en sus membranas que tienen un papel relevante en la maduración nuclear y/o citoplasmática. Previo al ICSI, los complejos cumulus-ovocito (CCO) son decumulados, y posteriormente son clasificados en función de su estado de maduración. El hecho de no eliminar todas las células de la granulosa en la decumulación, podría suponer una oportunidad de maduración completa, sin que ello implicara desventajas en el momento de la microinyección.

Nuestro objetivo fue evaluar si la decumulación parcial o total del complejo cúmulo-ovocito influía significativamente sobre las tasas de gestación, embarazo bioquímico, ectópicos y aborto de 1er trimestre de las pacientes incluidas en el estudio. Además se estudió si el proceso de microinyección también se veía afectado en función del método seguido al decumular.

MATERIAL Y MÉTODOS:

realizamos un estudio retrospectivo para evaluar las diferencias entre la decumulación total o parcial de los CCOs antes del ICSI. Se analizaron un total de 312 pacientes sometidas a un tratamiento de fecundación in vitro en el Hospital General Universitario de Valencia en el periodo comprendido entre mayo del 2005 y diciembre del 2008 (decumulación parcial, n = 148; decumulación total, n = 164), siendo la edad media de las pacientes de $33,9 \pm 3,6$ años. En los casos de decumulación parcial se incluyeron aquellos en los que la granulosa o bien estaba distribuida de forma homogénea, o en grupos. De los ovocitos microinyectados se transfirieron aquellos embriones de mejor calidad según parámetros morfológicos en día 2 o 3 de cultivo. El análisis estadístico se realizó mediante un test Chi-Cuadrado con el programa SPSS11.0.

RESULTADOS:

No se encontraron diferencias significativas en las tasas de embarazo en función del tipo de estrategia seguida en el momento de la decumulación, siendo un 48,6% cuando los CCOs se decumularon parcialmente y un 43,9% cuando se eliminaron las células de la

granulosa por completo ($P < 0,05$). Igualmente no hubo diferencias significativas cuando las variables analizadas eran embarazo bioquímico, ectópicos y aborto de 1er trimestre. En cuanto a la microinyección, tampoco se encontraron diferencias significativas en la tasa de fecundación entre aquellos CCOs decumulados parcial o totalmente. Con respecto a la microinyección, quisimos analizar si el método de decumulación seguido suponía una mayor o menor complicación técnica a la hora de microinyectar, pero se vio que no había diferencias en estos casos ($P < 0,05$).

CONCLUSIONES:

a la vista de los datos obtenidos encontramos que las células de la granulosa, según el método de trabajo de nuestro laboratorio, no ejercen una función ni positiva ni negativa sobre el ovocito, de manera que para nosotros ambos protocolos de decumulación serían igualmente válidos. Aún así, creemos que sería necesario realizar un estudio prospectivo en el que se estandarizasen los protocolos de decumulación según el grupo de estudio y con un tamaño muestral mayor para poder confirmar estos resultados.

140: EMBARAZO TRAS VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS Y REVITRIFICACIÓN EMBRIONES EN UNA RECEPTORA DE OVOCITOS

J. Herreros, G. Quea, E. Garijo, F. Galera, J. Muñoz
Instituto Madrileño de Fertilidad (IMF). Madrid.

OBJETIVO:

Reportar el embarazo en una paciente incluida en el programa de donación de ovocitos después de vitrificar los ovocitos y los embriones.

Diseño: Case report

MATERIAL Y MÉTODOS:

La hiperestimulación ovárica controlada en la donante de ovocitos se inició con FSHr-HMG en día 2 ó 3 del ciclo

menstrual y la desensibilización hipofisaria fue llevada a cabo usando cetorelix 0.25 mg (Cetrotide, Merck-Serono) cuando el folículo dominante tenía > 14 mm de diámetro, ó en día 5 – 6 de estimulación. La ovulación fue inducida con hCGr (Ovitrelle, Merck-

Serono) cuando la hiperestimulación ovárica dio como resultado al menos dos folículos > 18 mm de diámetro. Los ovocitos fueron vitrificados mediante el método Cryotop (Kitazato Biopharma Co. Japan). En la receptora de ovocitos la evaluación uterina se realizó mediante ecografía transvaginal con ultrasonidos (Voluson E8/ General Electric). La paciente recibió estradiol oral para la preparación endometrial (600 mg/día). Previamente se administró análogos de la GnRH debido a la presencia de ciclos menstruales regulares. El día de la desvitrificación de los ovocitos se le empezó a suministrar progesterona micronizada.

El siguiente ciclo (de la transferencia de congelados) fue realizado siguiendo el mismo protocolo.

RESULTADOS:

Nueve ovocitos fueron obtenidos tras punción folicular y fueron vitrificados un total de 6 ovocitos metafase II. Dos horas después de la desvitrificación de los ovocitos realizamos el ICSI. Tras valorar la fecundación, observamos 4 ovocitos fecundados y dos embriones fueron transferidos mientras que los otros dos embriones fueron vitrificados de nuevo. A los 12 días de la transferencia de los embriones evaluamos la beta-hCG en

suero sin lograr embarazo, por lo que en el siguiente ciclo le fueron transferidos los embriones vitrificados consiguiendo embarazo en este caso.

CONCLUSIONES:

Desde la implantación del método de la vitrificación, se ha especulado sobre el efecto deletéreo de utilizar altas concentraciones de crioprotectores, sin embargo, nosotros hemos comprobado la eficacia del método de la vitrificación manteniendo la viabilidad de ovocitos y embriones.

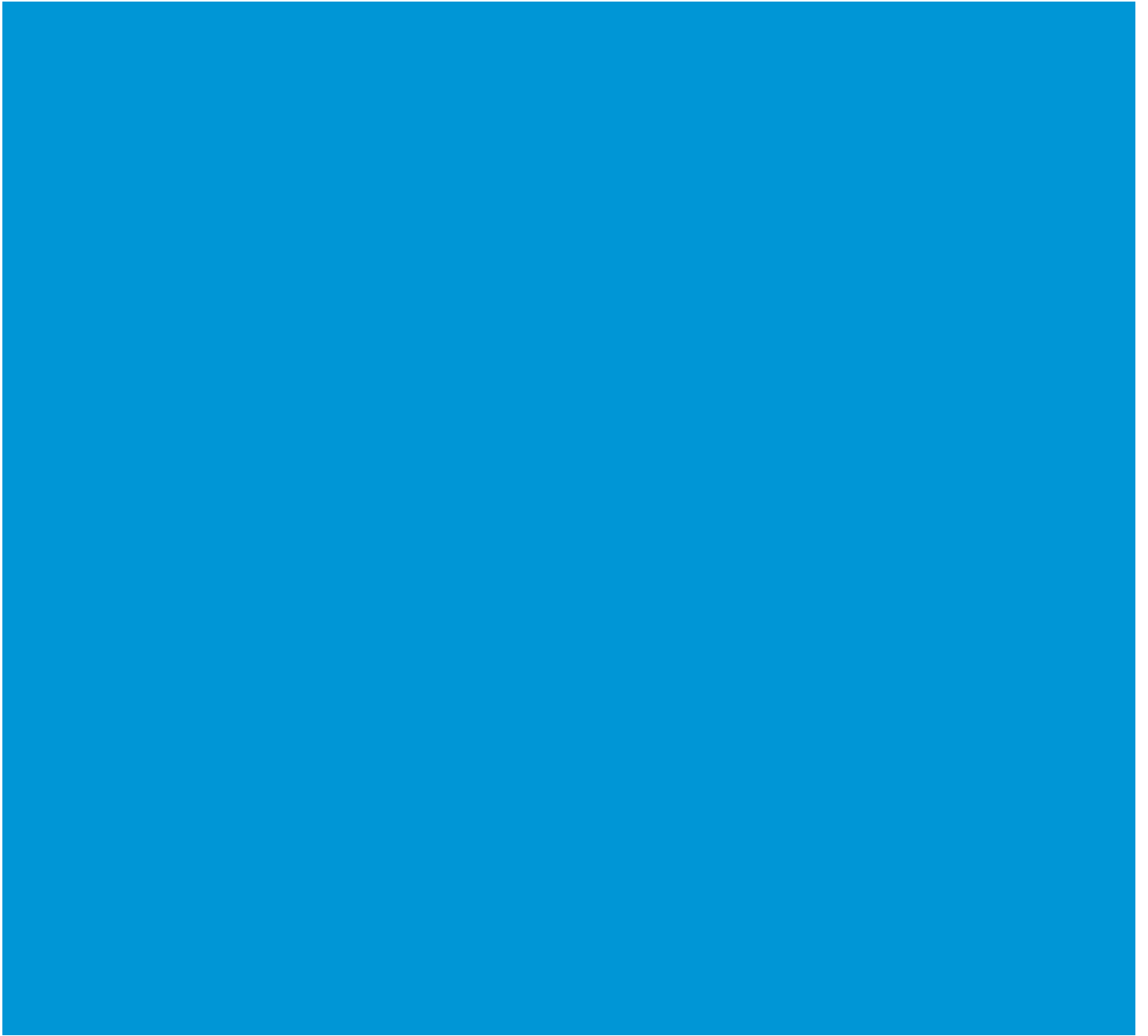
PRINCIPALES PATROCINADORES

PLATINO



OTROS PATROCINADORES





ASEBİR

