

REVISTA

ASEBIR



ASEBIR VI CONGRESO GIRONA 2011

SESIÓN DE ANDROLOGÍA

Estado Actual del Grupo de Interés de Andrología

Nuevas técnicas de selección de espermatozoides: Selección mediante separación magnética

Nuevas técnicas de selección de espermatozoides: Selección mediante IMSI

SESIÓN DE EMBRIOLOGÍA

Estado Actual del Grupo de Interés de Embriología

Técnicas de diagnóstico no invasivo de selección embrionaria

Uso en el laboratorio de la catalogación embrionaria de ASEBIR. Estado actual

AULA VIRTUAL

Cinematografía para el estudio de la calidad embrionaria: EmbryoScope

SESIÓN DE CALIDAD

Estado Actual del Grupo de Interés de Calidad del Laboratorio de Reproducción Asistida

Medidas de seguridad en el manejo de las muestras biológicas

Control de calidad en los procesos del laboratorio de embriología

SESIÓN DE GENÉTICA

Estado Actual del Grupo de Interés de Genética y Reproducción

Aplicación del array-CGH en el screening de aneuploidías

Estandarización de las técnicas de biología molecular al DGP

SESIÓN DE DEBATE

Embriólogos Clínicos: ¿Somos realmente lo que queremos ser?

EXPOSICIÓN PREMIOS ASEBIR-EMB 2009 / COMUNICACIONES ORALES / COMUNICACIONES PÓSTER / AGRADECIMIENTOS

CONTROL DE CALIDAD EXTERNO DEL LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA CLÍNICA

Parámetros sometidos a examen: Catalogación de embriones D+1, D+2 y D+3.
Comprobación de toxicidad de material.

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

Envío de muestra: Uno.

Envío documentación: Uno.

Envío de datos: Vía página web.

Informes: Valoración por consenso de laboratorios

Valoración por consenso de grupo de expertos

Proceso de datos: Informatizado.

Con la colaboración de:

Ceifer

SUMARIO

Pág.

EDITORIAL

Manuel Ardoy Vilches y Joan Sarquella i Ventura

2

PROGRAMA CIENTÍFICO CONGRESO ASEBIR

5

SESIÓN DE ANDROLOGÍA

Estado Actual del Grupo de Interés de Andrología
Alberto Pacheco

12

Nuevas técnicas de selección de espermatozoides: Selección mediante separación magnética
Sonja Grunewald

Nuevas técnicas de selección de espermatozoides: Selección mediante IMSI
Manuela Alonso Nieto

SESIÓN DE EMBRIOLOGÍA

Estado Actual del Grupo de Interés de Embriología
M^a José De los Santos

18

Técnicas de diagnóstico no invasivo de selección embrionaria
Mark G Larman, Petra Wale, Rebecca Collins, Michelle Lane, David K Gardner

Uso en el laboratorio de la catalogación embrionaria de ASEBIR. Estado actual
M^a Victoria Hurtado de Mendoza

SESIÓN DE CALIDAD

Estado Actual del Grupo de Interés de Calidad del Laboratorio de Reproducción Asistida
Antonio González-Utor

28

Medidas de seguridad en el manejo de las muestras biológicas
Montse Boada

Control de calidad en los procesos del laboratorio de embriología
Klaus E. Wiemer

SESIÓN DE GENÉTICA

Estado Actual del Grupo de Interés de Genética y Reproducción
Esther Velilla

39

Aplicación del array-CGH en el screening de aneuploidías
Mireia Sandalinas

Estandarización de las técnicas de biología molecular al DGP
Esther Fernández García

AULA VIRTUAL

Cinematografía para el estudio de la calidad embrionaria: EmbryoScope
Javier Herrero, Alberto Tejera, María Cruz, Marcos Meseguer

55

SESIÓN DE DEBATE

Embriólogos Clínicos: ¿Somos realmente lo que queremos ser?
Antonio Urries

64

EXPOSICIÓN PREMIOS ASEBIR-EMB 2009

Aplicación de la tecnología del EmbryoScope para la cuantificación de la calidad ovocitaria mediante el análisis de los patrones de respiración.
Javier Herrero, Alberto Tejera, María José de los Santos, Marcos Meseguer

67

Hibridación genómica comparada en célula única (SC CGH): Nueva herramienta para el screening genético preimplantacional (SGP)
Belén Lledó, José Antonio Ortiz, Ruth Morales, Rafael Bernabeu

COMUNICACIONES ORALES COMUNICACIONES PÓSTER

80
106

Diciembre 2011 Vol. 16 N°2

EDITA

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

EDITORES Y DIRECTORES CIENTÍFICOS

Dra. Marga Esbert Algam
IVI BARCELONA, Barcelona

Dr. Jorge Cuadros Fernández
CLÍNICA FIVMADRID, Madrid

COMITÉ EDITORIAL

Presidente:

Dr. Manuel Ardoy Vilches
HOSPITAL UNIVERSITARIO GREGORIO MARAÑÓN - Madrid

Vicepresidenta Responsable Certificación ASEBIR y Delegados Autonómicos:

Dra. Carmen Ochoa Marieta
CER. CLINICA COTERO - Santander

Secretaría, Publicaciones:

Dra. Montserrat Boada Palá
INSTITUT UNIVERSITARI DEXEUS - Barcelona

Tesorería y Relaciones con la Industria:

Dr. Fernando Marina Rugero
INSTITUTO DE REPRODUCCION CEFER - Barcelona

Vocalía de Grupos de Interés, Investigación y Certificación ASEBIR:

Dr. Josep Santaló Pedro
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA - Bellaterra

Vocalía de Congresos y Certificación ASEBIR:

Dra. Yolanda Mínguez Royo
IVI MADRID - Madrid

Vocalía de Docencia y Formación Continuada:

Dra. M^a José Torello Ybañez
HOSPITAL QUIRÓN, Barcelona
Dr. Ignacio Santiago Álvarez Miguel
INST. EXTREMEÑO REPRODUCCIÓN ASISTIDA -IERA -Badajoz

Dr. Juan Manuel Moreno García
CLINICA VISTAHERMOSA, Alicante

Dra. Marga Esbert Algam
IVI BARCELONA, Barcelona

Vocalía Página Web:

Dr. Juan Manuel Moreno García
CLINICA VISTAHERMOSA - Alicante

Vocalía de Publicaciones:

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

Dra. Marga Esbert Algam
IVI BARCELONA, Barcelona

Dra. Montserrat Boada Palá
INSTITUT UNIVERSITARI DEXEUS, Barcelona

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

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

PUBLICIDAD Y COLABORACIONES

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

DISEÑO, MAQUETACIÓN E IMPRESIÓN

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

Apreciados compañeros y compañeras

En nombre de todo el Comité Organizador y de la Junta de ASEBIR, es un placer poder daros la bienvenida a este VI Congreso Nacional.

ASEBIR es ya una Asociación adulta, consolidada y reconocida. Prueba de ellos es el aumento constante del número de socios y la organización de actividades científicas, de las cuales, el Congreso es el evento más importante.

El proyecto del Congreso de Girona nació hace varios años de un grupo muy reducido de personas que creyeron en la idea, pensaron que la ciudad podría ser una buena sede para el Congreso y han trabajado con ilusión para conseguirlo.

En esta edición hemos podido, gracias al esfuerzo de todos, presentar un interesante programa científico que contiene todos los aspectos más novedosos de nuestra especialidad. En esta misma línea se han pensado los Simposios Satélites, Aula Virtual y Sesión de Debate.

Pero hay más novedades.

Por primera vez se estructuran las sesiones científicas alrededor de los Grupos de Interés dándoles más protagonismo. Embriología, Genética, Calidad y Andrología. De esta forma esperamos poder despertar mayor interés y aprovechar mejor las sesiones.

Nueva forma de presentación y visualización de los pósters a través de pantallas táctiles.

Así mismo se han organizado 3 cursos pre-congreso.

- Curso de Gestión de Calidad del laboratorio de Embriología, organizado conjuntamente con ALPHA y el GI de Calidad.
- Biotecnología de la Reproducción: del modelo animal al modelo humano. Interesante curso que pretende dar a conocer los trabajos que se realizan en el modelo animal. Se celebra en colaboración con la Universitat de Girona.
- Curso de Genética Básica para Embriólogos

Durante el Congreso se celebrará la primera convocatoria del examen para la obtención de la Certificación ASEBIR en Reproducción Asistida Humana. Embriología Clínica.

Queremos agradecer de forma especial el esfuerzo realizado, en estos tiempos complicados para todos, por parte de nuestras empresas proveedoras. Este esfuerzo es imprescindible para la realidad del Congreso. Su colaboración continua con ASEBIR es muy importante y siempre agradecida por nuestra parte.

Gracias a todos los que habéis presentado comunicaciones, a los ponentes y moderadores. Vuestras aportaciones y rigor son garantía de éxito para el Congreso.

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

Y gracias también al Comité Organizador, Comité Científico y, como no a la secretaria Técnica de ASEBIR.

Daros la bienvenida a una ciudad, Girona, cosmopolita y acogedora que espera que vuestra estancia sea agradable y provechosa. Una ciudad en constante movimiento y transformación donde también es posible sentir la presencia de su Historia y encontrar el silencio y la paz interior en cualquier rincón de su Barrio Antiguo.

Os invitamos a descubrirlo.

Sigueu benvinguts a Girona, desitgem que us trobeu com a casa.

Bienvenidos a Girona, deseamos que os encontréis como en casa.



Joan Sarquella i Ventura
Presidente del Comité Organizador



Manuel Ardoy
Presidente de ASEBIR

Estimados socios, y no sólo socios, también a todos aquellos que comparten con ASEBIR el placer de poder celebrar un nuevo congreso, quisiera agradecerlos el estar de nuevo con nosotros, este año en Gerona.

Y cuando se dice la expresión de “este año”, no es algo que deba sonar a expresión ya hecha. Todos sabemos que “este año” implica una dificultad mayor de lo habitual. Aún así, ASEBIR continúa estando al lado de la ciencia, año tras año, intentando mejorar y aportar cada vez más al profesional, a los pacientes, y a la sociedad.

Pero permitidme que os dé un pequeño giro al agradecimiento. No sólo hace referencia a las personas asistentes a nuestra reunión, va dirigida también de forma muy especial a las empresas, y sobre todo a aquellas que podríamos considerar históricas, que año tras año ponen su confianza en manos de ASEBIR. Con la esperanza de que nuestra gestión generará los frutos que finalmente el profesional del laboratorio, o de docencia, o investigación... necesita, y que en especial las sociedades científicas están capacitadas para generar con el apoyo necesario de las casas comerciales.

De nuevo gracias a todas las partes de este poliedro que conforma finalmente ASEBIR, y muy especialmente a vosotras, las empresas colaboradoras, que de forma continuada e histórica confiáis en nosotros.

Un afectuoso saludo, y deseo de que continuemos en este camino,



Manuel Ardoy Vilches
Presidente de ASEBIR

Vit Kit® - Freeze and Vit Kit® - Thaw



- Scientifically proven formulation that increases pregnancy rates*
- First vitrification media cleared by the FDA
- Superior DMSO based media



Werfen Group

IZASA

Para más información : irvine@izasa.es o visite nuestra web www.izasa.es

Only from Irvine Scientific



IrvineScientific
Grow With Us™



ASEBIR

VI CONGRESO GIRONA 2011

COLABORACIÓN ESPECIAL



PRINCIPAL PATROCINADOR

OTROS PATROCINADORES



COMITÉ DE HONOR

Excmo. Sr. D. Carles Puigdemont i Casamajó
Alcalde de Girona

Excma. Dra. Dña. Anna María Geli de Ciurana
Rectora Mgca. de la Universidad de Girona

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

COMITÉ ORGANIZADOR

COMITÉ CIENTÍFICO

Presidente

Joan Sarquella i Ventura

Vocales

Begoña Aran
Sergi Bonet
Joan Carrera
María Fernández Reig
Eugenia Francisco-Busquets
Nuria Gimbernat

Marck Grossmann
Mariona Hugas
Nuria Porcar
Anna Rabanal
Mª José Torelló
Francesca Vidal

Santiago Álvarez
Montserrat Boada
Dolors Company
Mª José de los Santos
Esther Fernández
Emilio Gómez
Antonio L. González-Utor

Vocales

Carles Giménez
María Dolores Lozano
Yolanda Minguez
Inmaculada Molina
Alberto Pacheco
Mario Sousa
Antonio Urries



SECRETARÍA TÉCNICA

GRUPO **PROCESS**
marketing & formación

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: vicongreso@asebir.com

CRÉDITOS Y AUSPICIOS

- Actividad **Acreditada** por el Consejo Catalán de Formación Continuada de las Profesiones Sanitarias – Comisión de Formación Continuada del Sistema Nacional de Salud, con 1,6 Créditos, (Actividad de Formación Continuada registrada con el número 09/02940-BQ)



- Congreso **Auspiciado** por:



CURSOS PRECONGRESO

Miércoles, 5 de Octubre de 2011

- **Curso nº 1.** Gestión de Calidad en el Laboratorio de Embriología Clínica
- **Curso nº 2.** Biotecnología de la Reproducción: del Modelo Animal al Modelo Humano
- **Curso nº 3.** Fundamentos de Genética Básica para Embriólogos

PROGRAMA CIENTÍFICO



VI CONGRESO GIRONA 2011

MIÉRCOLES, 5 DE OCTUBRE DE 2011

15:00 - 20:00 hrs. Apertura de Secretaría

16:00 - 16:40 hrs. Bienvenida y recogida de documentación

16:40 - 17:00 hrs. Inauguración oficial del VI Congreso Nacional ASEBIR

17:00 - 19:00 hrs. Sesión de Andrología.

Moderadores: Dr. Fernando Marina (CEFER, Barcelona) y Dra. Margarida Esbert (IVI, Barcelona)

17:00 - 17:40 hrs. Estado actual del Grupo de Interés de Andrología.

Ponente Dr. Alberto Pacheco, IVI Madrid

17:40 - 18:20 hrs. Nuevas técnicas de selección de espermatozoides: Selección mediante separación magnética

Ponente Dra. Sonja Grunewald, Universitätsklinikum Leipzig, Leipzig, Germany

18:20 - 19:00 hrs. Nuevas técnicas de selección de espermatozoides: Selección mediante IMSI

Ponente Dra. Manuela Alonso, IVI Madrid

19:00 - 19:30 hrs. Pausa y visita Pósters.

19:30 - 20:30 hrs. Comunicaciones Orales Andrología.

Moderadores: Dr. José Antonio Castilla (H. U. Virgen de las Nieves, Granada) y Dra. Mariona Hugas (Clínica Girona, Girona)

19:30 - 19:40 hrs. Comunicación 0-001: Aplicación de las redes neuronales al estudio de la influencia de los factores ambientales en la calidad seminal.

JL Girela¹; D Gil²; MJ Gómez-Torres¹; M Johnsson³; J De Juan¹

¹Departamento de Biotecnología; Universidad de Alicante; España. ²Departamento de Tecnología informática y computación; Universidad de Alicante; España. ³Departamento de Ciencias Cognitivas; Universidad de Lund; Suecia.

19:40 - 19:50 hrs. Comunicación 0-002: Efecto del polimorfismo (TA)n del promotor del receptor de estrógenos alfa (ERA) sobre el recuento espermático.

J. A. Ortiz¹; B. Lledó¹; R. Morales¹; J. Llácer² y R. Bernabeu^{1,3}.

¹Instituto Bernabeu Biotech; ²Instituto Bernabeu Elche; ³Instituto Bernabeu, Alicante

19:50 - 20:00 hrs. Comunicación 0-003: Patrones de distribución de los receptores de canabinoides; CB1 y CB2; en espermatozoides humanos frescos; capacitados y reaccionados acrosómicamente.

M. M. Francou; E. García-Hernández; J. L. Girela; M. J. Gómez-Torres; J. Ten; R. Bernabeu; J. De Juan

Departamento de Biotecnología; Universidad de Alicante, Alicante

20:00 - 20:10 hrs. Comunicación 0-004: El efecto negativo de la fragmentación del DNA espermático sobre la calidad embrionaria.

J. L. de Pablo¹; C. Anarte¹; A. Domingo¹; I. Ausin¹; J. A. Agirregoikoa^{1,2}; G. Barrenetxea^{1,2}.

¹Quirón Bilbao; Unidad de Reproducción Asistida; Vizcaya; España. ²Universidad del País Vasco (UPV); Vizcaya; España

20:10 - 20:20 hrs. Comunicación 0-005: El uso de las columnas de anexina (MACS) en pacientes con fragmentación de ADN en espermatozoides humanos mejora la calidad embrionaria y la tasa de embarazo.

Y. Franco; MJ. Lázaro; I. Lizaso; M. García; S. Cornago; N. Maiz; I. Alzola

Centro Sanitario Virgen del Pilar, San Sebastian, Gipuzkoa

20:20 – 20:30 hrs. **Comunicación 0-006:** Cambios citomorfológicos tras la congelación / descongelación en sujetos normos; astenos y oligozoospermicos.

¹MJ. Gómez-Torres,¹LL. Medrano-López, ^{1,2}A. García, ¹EM. García, ²PJ Fernández-Colom, ¹J. De Juan.

¹Departamento de Biotecnología, Universidad de Alicante. ²Servicio de Ginecología (Reproducción Humana), Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia

20:30 hrs. Cocktail Inaugural en el Auditori Palau de Congressos

JUEVES, 6 DE OCTUBRE DE 2011

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

09:00 - 11:00 hrs. Sesión de Embriología.

Moderadores: Dra. M^a José Torelló (H. Quirón, Barcelona) y Dra. Inmaculada Molina (H. U. La Fe, Valencia)

09:00 - 09:40 hrs. Estado actual del Grupo de Interés de Embriología.

Ponente Dra. M^a José de los Santos, IVI Valencia

09:40 - 10:20 hrs. Técnicas de diagnóstico no invasivo de selección embrionaria.

Ponente Dr. Mark Graham Larman, Vitrolife, Colorado (USA)

10:20 - 11:00 hrs. Uso en el laboratorio de la catalogación embrionaria de ASEBIR. Estado actual.

Ponente Dra. Victoria Hurtado de Mendoza, Centro Másvida Reproducción, Sevilla

11:00 - 11:30 hrs. Pausa café.

11:30 - 12:30 hrs. Comunicaciones Orales Embriología

Moderadores: Dra. Yolanda Mínguez (IVI, Madrid) y Dr. Emilio Gómez (TAHE Fertilidad, Murcia)

11:30 – 11:40 hrs. **Comunicación 0-007:** Predicción de la implantación mediante análisis multivariable basado en la morfocinética embrionaria utilizando un sistema automático de cinematografía.

*M. Meseguer; J. Herrero; A. Tejera; T. Vilorio; A. Delgado; MJ de los Santos
IVI Valencia, Valencia.*

11:40 – 11:50 hrs. **Comunicación 0-008:** ¿Puede la respiración embrionaria predecir la implantación?

A. Tejera¹; J. Herrero¹; N. Ramsing²; M. J. De los Santos¹; M. Meseguer¹.

¹IVI Valencia; IVF Laboratory; Valencia; Spain. ²Unisense Fertilittech; Designand Development; Aarhus; Denmark.

11:50 – 12:00 hrs. **Comunicación 0-009:** Fallos de fecundación tras FIV/ICSI: Nuevas estrategias de interpretación para el diagnóstico.

M. Ferrer; E. Ferrer; M. Muñoz; M. Vila; V. Y. Rawe

CREA; Centro Médico de Reproducción Asistida; Valencia

12:00 – 12:10 hrs. **Comunicación 0-010:** Marcaje directo de embriones de ratón para su identificación mediante adhesión de microcódigos a la zona pelúcida

S. Novo¹, O. Penon^{2,3}, R. Gómez⁴, LL. Barrios¹, M. Duch⁴, J. Esteve⁴, J. Santaló¹, C. Nogués¹, J. A. Plaza⁴, LL. Pérez-García^{2,3}, E. Ibáñez^{1}*

¹Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.

²Departament de Farmacologia i Química terapèutica, Facultat de Farmàcia. ³Institut de Nanociència i Nanotecnologia, Universitat de Barcelona. ⁴Institut de Microelectrònica de Barcelona IMB-CNM (CSIC).Barcelona.

12:10 – 12:20 hrs. **Comunicación 0-011:** Preservación de la fertilidad en pacientes oncológicas:

Combinación de criopreservación de tejido ovárico y maduración In Vitro de ovocitos.

P. Torres¹, E. Novella-Maestre², J.M. Rubio¹, I. Peinado¹, P. Polo¹, M. Romeu¹, M. Andrés³, A. Pellicer¹.

¹Unidad de Reproducción Humana (Servicio de Ginecología), Hospital Universitario La Fe, Valencia. ²Unidad de Genética, Hospital Universitario La Fe, Valencia. ³Unidad de Oncología Pediátrica, Hospital Universitario La Fe, Valencia.

12:20 – 12:30 hrs. **Comunicación O-012:** Influencia de las uniones adherentes mediadas por e-cadherina en la derivación de células madre embrionarias de ratón.

S. González; E. Ibáñez; J. Santaló

Unitat Biologia Cel·lular. Fac. Biociències. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra

12:45 - 13:30 hrs. Symposium Satélite EMB

IVF Witness. RFID (Radio frequency identification) technology to reduce the risk of IVF errors

Ponente Dr. Ronny Janssens. Centre for Reproductive Medicine, UZB, Brussels.

13:30 - 15:30 hrs. Comida congresual

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

15:30 - 17:30 hrs. Sesión de Calidad.

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

15:30 - 16:10 hrs. Estado actual del Grupo de Interés de Calidad del Laboratorio de Reproducción Asistida

Ponente Dr. Antonio L. González-Utor, Centro Masvida Reproducción, Sevilla

16:10 - 16:50 hrs. Medidas de seguridad en el manejo de las muestras biológicas

Ponente Dra. Montserrat Boada, Institut Universitari Dexeus, Barcelona

16:50 - 17:30hrs. Control de calidad en los procesos del laboratorio de embriología

Ponente Dr. Klaus Wiemer, Northwest Center for Reproductive Sciences, Seattle, USA

17:30 - 18:00 hrs. Pausa y visita Pósters

18:00 - 19:00 hrs. Comunicaciones Orales Calidad del Laboratorio de Reproducción Asistida

Moderadores: Dr. Mark Grossmann (Centro Médico Teknon, Barcelona) y Dr. Yosu Franco (Centro Sanitario Virgen del Pilar, San Sebastián)

18:00 – 18:10 hrs. **Comunicación O-013:** Reducir los errores en Fiv: Witnessing electrónico.

X. Orriols Brunetti¹; S. Bird¹; K. Bennett¹; S. Rogers¹; C. Ottolini^{1;2}; L. Muriel Rios¹; J. Taylor¹; A. Thornhill¹

¹The London Bridge Fertility; Gynaecology and Genetics Centre; London; Reino Unido; ²Department of Biosciences; University of Kent; Canterbury; Reino Unido

18:10 – 18:20 hrs. **Comunicación O-014:** Papel del fungible en la generación de componentes volátiles orgánicos (CVO) en el laboratorio de Fiv.

F. Marina; N. Pérez; N. Fosas; P. Martín; N. García; S. González; I. Mansilla; M. Roderó; A. Mauri y S. Marina

Instituto de Reproducción CEFER. ANACER, Barcelona

18:20 – 18:30 hrs. **Comunicación O-015:** La elección del medio de cultivo como estrategia de mejora de resultados.

C. Bou; D. Becerra; M. Testillano; A. Martínez; A. Rodríguez; F. Bronet

IVI Madrid, Madrid

18:30 – 18:40 hrs. **Comunicación O-016:** Uso de la tecnología de la luz polarizada para la corrección de la posición del huso acromático previo al ICSI.

A. Farreras¹; M. Asensio¹; P. Fernández¹; C. Castelló¹; B. Peramo¹; M. López-Tejón^{1;2}; E. Velilla¹

Institut Marquès¹; Barcelona; Fundació Leonardo Marquès²; Barcelona.

18:40 – 18:50 hrs. **Comunicación O-017:** Estudio aleatorizado para comparar la eficacia de dos estrategias de transferencia embrionaria en un hospital público: resultados preliminares.

A. Clavero; J. A. Castilla; I. Molina; E. R. Palacios; A. P. Ortiz; S. Carrillo; J. Fontes

Unidad de Reproducción. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada

18:50 – 19:00 hrs. **Comunicación O-018:** Transferencia diferida: ¿práctica rutinaria?

M. Lierta; C. Roméu; J. Sánchez Rubio; A. Chueca; A. Urries.

Reproducción Asistida Quirón Zaragoza; Grupo Hospitalario Quirón.

VIERNES, 7 DE OCTUBRE DE 2011

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

09:00 - 11:00 hrs. Sesión de Genética.

Moderadores: Dr. Josep Santaló (UAB, Barcelona) y Dr. Julio Martín (IVI, Valencia)

09:00 - 09:40 hrs. Estado actual del Grupo de Interés de Genética y Reproducción

Ponente Dra. Esther Velilla, Centro de Medicina Embrionaria, Barcelona

09:40 - 10:20 hrs. Aplicación del array-CGH en el screening de aneuploidías

Ponente Dra. Mireia Sandalinas, Reprogenetics Spain, Barcelona

10:20 - 11:00 hrs. Estandarización de las técnicas de biología molecular al DGP

Ponente Dra. Esther Fernández, Geniality Diagnostico Genético, Madrid

11:00 - 11:30 hrs. Pausa café

11:30 - 12:30 hrs. Comunicaciones Orales Genética

Moderadores: Dra. Francesca Vidal (UAB, Barcelona) y Dr. Fràncisc Xavier Vendrell (Sistemas Genómicos, Valencia)

11:30 - 11:40 hrs. **Comunicación 0-019:** El DGP molecular combinado con microarrays de CGH: Una nueva estrategia diagnóstica.

T M Alberola; R Bautista-Llàcer; C Sánchez-Matamoros; M Pardo; E García-Mengual y X Vendrell.

Sistemas Genómicos, Paterna, Valencia

11:40 - 11:50 hrs. **Comunicación 0-020:** DGP para estudio de aneuploidías de 24 cromosomas mediante aCGH: Diagnóstico en célula única de día 3 vs. biopsia de trofoectodermo de día 5.

L. Rodrigo; P. Mir; E. Mateu; A. Mercader; A. Cervero; P. Buendía; J. Martín; C. Rubio

Departamento de Diagnóstico Genético Preimplantacional. Instituto Universitario IVI-Valencia. Valencia, España

11:50 - 12:00 hrs. **Comunicación 0-021:** Error de diagnóstico de la técnica de diagnóstico genético preimplantacional para 24 cromosomas mediante FISH.

E. Toro¹; S. Fernández^{1,2}; A. Colomar^{1,2}; S. Chamosa¹; M. López Tejjón³, E. Velilla^{1,2}

¹Institut Marquès, Barcelona; ²Centro de Medicina Embrionaria, Barcelona-Madrid; ³Fundación Leonardo Marquès, Barcelona

12:00 - 12:10 hrs. **Comunicación 0-022:** Diagnóstico prenatal no invasivo (DPNI) en sangre de gestante: Una nueva opción tras DGP.

A. Bustamante-Aragonés; S. Perlado; M.J. Trujillo-Tiebas; J. Gallego; L. Rodríguez¹; C. Linares¹; M. Rodríguez de Alba; I. Lorda; J. Plaza¹; C. Hernández¹; C. Ramos.

Servicios de Genética y Ginecología y Obstetricia¹; Fundación Jiménez Díaz. Madrid

12:10 - 12:20 hrs. **Comunicación 0-023:** Mosaicismo en pacientes con síndrome de Klinefelter:

Implicaciones en el consejo genético reproductivo.

¹García-Quevedo, L.; ¹Blanco, J.; ¹Sarrate, Z.; ²Bassas, LL.; ³Català, V.; ¹Vidal, F.

¹Unitat Biologia Cel·lular. Universitat Autònoma Barcelona. Bellaterra, Barcelona. ²Laboratori d'Andrologia, Fundació Puigvert. Barcelona.

³Prenatal Genetics, SL. Barcelona.

12:20 - 12:30 hrs. **Comunicación 0-024:** Detección mediante SNaPshot de la delección en homocigosis del gen SMN1 en el diagnóstico genético preimplantacional de atrofia muscular espinal.

M. Martínez-Fresno¹ (1); A. Gómez Duro¹; P. Eibes Peteiro¹; A. Sotillo¹; E. Gómez²; E. Fernández¹

¹Geniality Diagnóstico Genético, Madrid; ²Instituto Tahe de Fertilidad y Ginecología, Murcia

12:30 - 13:15 hrs. Symposium Satélite ORIGIO

Physiologic ICSI

Ponente Dr. Lodovico Parmegiani. GynePro Medical Centers, Bologna, Italy.

13:15 - 14:15 hrs. XXV Asamblea de Socios ASEBIR

14:15 - 16:00 hrs. Comida congresual

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

16:00 - 16:40 hrs. Exposición 4 Pósters seleccionados para discusión

Moderadores: Dra. Carmen Ochoa (CER. Clínica Cotero Santander, Santander) y Dra. M^a Dolores Lozano (H. U. Virgen del Rocío, Sevilla)

16:40 - 17:20 hrs. Aula Virtual

Moderadores: Dra. Gemma Arroyo (I. U. Dexeus, Barcelona) y Dra. Mercé Durban (Clínica Eugén, Barcelona)

Embryoscope

Ponente Dr. Marcos Meseguer, IVI Valencia

17:20 - 18:00 hrs. Sesión de Debate

Moderadores: Dr. Jorge M. Cuadros (FIV-Madrid, Madrid) y Dra. Gloria Calderón (IVI, Barcelona)

Embriólogos clínicos: ¿somos realmente lo que queremos ser?

Ponente Dr. Antonio Urries, Clínica Quirón, Zaragoza

18:00 - 18:30 hrs. Pausa y visita Pósters

18:30 - 18:45 hrs. Premio ASEBIR al Mejor Póster 2011

18:45 - 19:05 hrs. Exposición Premios ASEBIR-EMB 2009

Moderadores: Dra. Anna Rabanal (Barcelona IVF, Barcelona) y Dr. Ignacio Santiago Álvarez (IERA, Badajoz)

18:45 - 18:55 hrs. Premio ASEBIR-EMB 2009 de Embriología Clínica

Aplicación de la tecnología del embryoscope para la cuantificación de la calidad ovocitaria mediante el análisis de los patrones de respiración.

Ponente Dr. Javier Herrero Zapata, IVI Valencia

18:55 - 19:05 hrs. Premio ASEBIR-EMB 2009 de Investigación Básica

Hibridación genómica comparada en célula única (SC CGH): nueva herramienta para el screening genético preimplantacional (SGP).

Ponente Dra. Belén Lledo Bosch, Instituto Bernabeu, Alicante

19:05 - 19:15 hrs. Clausura VI Congreso Nacional ASEBIR 2011

21:30 hrs. Cena de Clausura, anuncio y entrega de los Premios ASEBIR-EMB 2011



ESTADO ACTUAL DEL GRUPO DE INTERÉS DE ANDROLOGÍA

Alberto Pacheco

El Grupo de Interés presentará la actualidad del trabajo realizado, los proyectos en marcha y las propuestas de futuro del grupo.

NUEVAS TÉCNICAS DE SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES: SELECCIÓN MEDIANTE SEPARACIÓN MAGNÉTICA

Sonja Grunewald

PD Dr. med. habil. University of Leipzig, European Academy of Andrology Training Centre, Leipzig, Germany.

e-mail: sonja.grunewald@medizin.uni-leipzig.de

INTRODUCTION

Male infertility is the sole or contributing factor in almost half of the couples failing to conceive (Sharlip et al., 2002). Semen analysis including the assessment of sperm concentration, motility and percentage normal forms is the standard procedure for evaluating the male fertility potential (World Health Organization, 2010). Although the conventional analysis gives considerable information, it does not provide information about impaired sub-cellular processes in human sperm and defined pathophysiological diagnosis of male infertility is often missed. In recent years many studies investigated the presence and significance of activated pathways of programmed cell death (apoptosis) in spermatozoa, which may be partially responsible for the low fertilization and implantation rates seen with assisted reproductive techniques (Oehninger et al., 2003).

The term apoptosis defines programmed cell death, which is molecularly and morphologically distinct from necrosis (Kerr et al., 1972). Models of apoptosis as known from somatic cells include receptor-mediated pathways and intrinsic triggered apoptosis (mediated by disruption of mitochondria membrane potential) in addition to cytotoxic or stress-induced forms (Green, 1998). Both, extrinsic and intrinsic pathways result in activation of proteases (cytosolic aspartate specific proteases, CASPASES, [CP]) and as a consequence in well orchestrated cell degradation (Salvesen et al.,

1997). Signs of the terminal phase of apoptosis are the externalisation of the phospholipid phosphatidylserine at the outer side of the plasmamembrane (early), DNA fragmentation and morphologic changes (late).

While receptor mediated apoptosis signal transduction might be of rather minor functional relevance in human ejaculated spermatozoa (Grunewald et al., 2005a), sperm mitochondria are especially susceptible to cellular stress due to the compartmentalization in the midpiece. Certain studies proved that the classical mitochondria-derived apoptosis signalling-cascade is activated in spermatozoa by specific pro-apoptotic stimuli as well as by cryopreservation and thawing (Grunewald et al., 2005a; Oehninger et al., 2003; Paasch et al., 2004b; Paasch et al., 2003; Perticarari et al., 2008; Wang et al., 2003). High levels of DNA fragmentation are one major endpoint and an archetypal signature of the apoptosis process. However, due to the highly packed, condensed chromatin in sperm, the apoptosis signal is only insufficiently transferred into DNA fragmentation. Particularly the release of ROS from mitochondria contributes directly to sperm DNA damage (Aitken et al., 2011). DNA fragmentation is a significant factor in defining the functionality of spermatozoa and has been linked in numerous studies with a wide variety of adverse clinical outcomes including impaired fertilization, disrupted preimplantation embryonic development, poor implantation rates and an increased incidence of miscarriage (Zini et al., 2008).

Although the sperm apoptosis cascade might differ from somatic cells, activated apoptosis signalling in human ejaculated spermatozoa is associated with impaired fertilization capacity. Male infertility is only a symptom for a variety of spermatozoal defects originating from different andrological diseases. Possibly, the increased susceptibility on pro-apoptotic stimuli and activation of apoptosis signalling is a common mechanism for various sperm pathologies.

Several studies indicate that semen samples from infertility patients contain higher levels of activated caspases and disrupted mitochondrial membrane potential compared to healthy donors (Gandini et al., 2000; Grunewald et al., 2005b; Grunewald et al., 2010; Grunewald et al., 2009; Shen et al., 2002).

Subgrouping analysis of the infertility patients revealed that the percentage of caspase-positive sperm was elevated in patients with pathological spermiogram compared to fertile donors, but almost equally elevated in those patients showing normal spermiogram parameter (Grunewald et al., 2005b). Semen samples with oligoasthenozoospermia show higher incidences of sperm with apoptotic features compared to samples with normozoospermia (Marchiani et al., 2007). This might be explained by alterations of the mitochondrial membrane potential, which severely affect sperm motility. Another example are semen samples from patients with varicocele, which contain significantly more sperm with active apoptosis cascade than samples from donors

without varicocele. The effect may be explained by the higher testicular temperatures in the varicocele patients (Chen et al., 2004).

A negative impact of activated apoptosis signalling on sperm fertilizing capacity was assumed and recent studies using hamster oocytes proved this relationship. All studies used animal models to simulate either in vitro fertilization (IVF) by the zona-free hamster oocyte sperm penetration assay (SPA) or the intracytoplasmic sperm injection (ICSI) by hamster oocyte-ICSI (H-ICSI).

Using the SPA, increased oocyte penetration potential was directly correlated with the absence of apoptosis markers in human donor sperm (Said et al., 2006; Sion et al., 2004). Analyses of semen samples of infertility patients revealed an even stronger negative correlation between the apoptosis-related parameters: disruption of the mitochondria membrane potential, activation of caspase-3 as well as externalized phosphatidylserine and the performance of the spermatozoa in the hamster oocyte penetration assay. Semen samples showing subnormal SPA values (<20% penetrated oocytes) were characterized by significantly increased levels of disruption of the mitochondrial membrane potential, activation of caspase-3 and externalized phosphatidylserine (Grunewald et al., 2008), indicating an impact of apoptosis-related processes not only at the plasma membrane but also at the mitochondrial and cytoplasmic level on the spermatozoal capacity to penetrate oocytes.

Analysis of sperm performance in hamster oocyte-ICSI revealed a negative correlation of fertilization rates with the percentage of apoptotic sperm in samples from infertility patients (Grunewald et al., 2009).

Due to the limitation of the animal model, the assessment of embryonic development was not possible, but many other studies proved the correlation of DNA fragmentation with later stages of the fertilization process such as embryonic development, the blastocyst development rate and clinical pregnancy rates (Zini et al., 2008).

MATERIALS AND METHODS

POTENTIAL OF STANDARD SPERM SEPARATION METHODS

Over the last decades a variety of standard procedures have been developed with certain modifications. These conventional sperm selection techniques can be classified by their basis on centrifugation, filtration or sperm migration. Among the centrifugation techniques, density gradient centrifugation (DGC) has been proposed as the gold standard for sperm preparation.

As mentioned above, semen samples of subfertile patients contain higher levels of spermatozoa with activated apoptosis signalling which is likely to impair their fertility.

Own investigations of semen samples from healthy donors showed a significant reduction of sperm with activated apoptosis signalling by DGC (Said et al., 2005a). Moreover, ejaculates of 20 subfertile men were investigated before and after DGC followed by a swim up procedure. While the amount of apoptotic sperm was reduced in the majority of the samples, profound inter-individual differences in the separation effect ranging from <1% up to >65% were observed (Grunewald et al., 2010). Therefore, further development of specific, molecular-based separation methods to deplete apoptotic spermatozoa is needed.

ANNEXIN-V BASED MAGNETIC ACTIVATED CELL SORTING: DEPLETION OF SPERM WITH ACTIVE APOPTOSIS SIGNALLING

Currently available molecular-based methods to deplete sperm with activated apoptosis signalling are based on the specific binding of Annexin-V to externalized phosphatidylserine (Glander et al., 1999; Grunewald et al., 2001; Said et al., 2006; von Schonfeldt et al., 1999).

Externalisation of phosphatidylserine (EPS) is one of the first external features of cells undergoing apoptosis. In somatic cells, it is a sign of the beginning terminal phase of the programmed cell death (Vermes et al., 1995). The externalisation of phosphatidylserine

can also be found in non-vital sperm with holey membranes and in bicarbonate-exposed, artificially capacitated, sperm (De Vries et al., 2003).

The loss of membrane asymmetry in sperm is independent of standard spermogram parameters (World Health Organization, 2010) and more frequent in infertility patients (Glander et al., 1999). The amount of EPS in donor sperm correlates with the level of lipid peroxidation (Schuffner et al., 2001). In addition, it correlates directly with the activation of caspases and the disruption of the transmembrane mitochondrial potential (Kotwicka et al., 2008; Paasch et al., 2004a; Paasch et al., 2003; Said et al., 2006).

Annexin V is a phospholipid-binding protein that has high affinity for phosphatidylserine and lacks the ability to pass through an intact membrane (van Heerde et al., 1995). Annexin V-conjugated super-paramagnetic microbeads can effectively separate non-apoptotic spermatozoa from those with deteriorated plasma membranes using magnetic-activated cell sorting (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Annexin-V MACS separation of sperm yields two fractions: EPS-negative (intact membranes, nonapoptotic) and EPS-positive (apoptotic) which is retained in the magnetic field (Grunewald et al., 2001; Paasch et al., 2003).

RESULTS AND DISCUSSION

Many own studies proved the ability of Annexin-V MACS to enrich vital, motile sperm with inactivated apoptosis signalling and lower DNA fragmentation rate (Grunewald et al., 2001; Grunewald et al., 2006b; Paasch et al., 2004a; Paasch et al., 2003). Moreover, selected non-apoptotic sperm are characterized by a superior ability to undergo capacitation and acrosome reaction (not spontaneous acrosome reaction!) (Grunewald et al., 2006a; Lee et al., 2010). The depletion of sperm with activated apoptosis signalling is able to increase cryosurvival rates by integration of MACS before or after cryopreservation and thawing of sperm said (Grunewald et al., 2006b; Paasch et al., 2004a; Said et al., 2005b).

Sperm preparation that combines MACS with double-density centrifugation provides spermatozoa of higher quality in terms of motility, viability and apoptosis indices (caspase activation, mitochondrial membrane disruption and DNA fragmentation) compared with other conventional sperm preparation methods (Said et al., 2005a). Furthermore, sperm prepared according to this protocol showed improved ability to fertilize eggs using the hamster oocyte penetration assay and hamster oocyte-ICSI (Grunewald et al., 2009; Said et al., 2006).

In recent years, first clinical studies and reports proved the advantage of integrating Annexin-V MACS in conventional sperm preparation protocols. The combination leads to superior pregnancy rates and so far, healthy babies (Dirican et al., 2008; Rawe et al., 2010). Currently, the manufacturer is working to produce a GMP-conform Annexin V MACS kit.

REFERENCES

- Aitken RJ, Koppers AJ (2011) Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl* 13:36-42
- Chen CH, Lee SS, Chen DC, Chien HH, Chen IC, Chu YN, Liu JY, Chen WH, Wu GJ (2004) Apoptosis and kinematics of ejaculated spermatozoa in patients with varicocele. *J Androl* 25:348-353
- De Vries KJ, Wiedmer T, Sims PJ, Gadella BM (2003) Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells. *Biol.Reprod* 68:2122-2134
- Dirican EK, Ozgun OD, Akarsu S, Akin KO, Ercan O, Ugurlu M, Camsari C, Kanyilmaz O, Kaya A, Unsal A (2008) Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. *J.Assist.Reprod.Genet.* 25:375-381
- Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, Dondero F, Lenzi A (2000) Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum.Reprod.* 15:830-839
- Glander HJ, Schaller J (1999) Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol. Hum.Reprod.* 5:109-115
- Green DR (1998) Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 94:695-698
- Grunewald S, Baumann T, Paasch U, Glander HJ (2006a) Capacitation and acrosome reaction in nonapoptotic human spermatozoa. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1090:138-146
- Grunewald S, Miska W, Miska G, Rasch M, Reinhardt M, Glander HJ, Paasch U (2007) Molecular glass wool filtration as a new tool for sperm preparation. *Hum.Reprod.* 22:1405-1412
- Grunewald S, Paasch U, Glander HJ (2001) Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. *Cell Tissue Bank.* 2:127-133
- Grunewald S, Paasch U, Said TM, Rasch M, Agarwal A, Glander HJ (2006b) Magnetic-activated Cell Sorting before Cryopreservation Preserves Mitochondrial Integrity in Human Spermatozoa. *Cell Tissue Bank.* 7:99-104
- Grunewald S, Paasch U, Said TM, Sharma RK, Glander HJ, Agarwal A (2005a) Caspase activation in human spermatozoa in response to physiological and pathological stimuli. *Fertil.Steril.* 83 Suppl 1:1106-1112
- Grunewald S, Paasch U, Wuendrich K, Glander HJ (2005b) Sperm caspases become more activated in infertility patients than in healthy donors during cryopreservation. *Arch.Androl* 51:449-460
- Grunewald S, Reinhardt M, Blumenauer V, Hmeidan AF, Glander HJ, Paasch U (2010) Effects of post-density gradient swim-up on apoptosis signalling in human spermatozoa. *Andrologia* 42:127-131
- Grunewald S, Reinhardt M, Blumenauer V, Said TM, Agarwal A, Abu HF, Glander HJ, Paasch U (2009) Increased sperm chromatin decondensation in selected nonapoptotic spermatozoa of patients with male infertility. *Fertil.Steril.* 92:572-577
- Grunewald S, Said TM, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A (2008) Relationship between sperm apoptosis signalling and oocyte penetration capacity. *Int.J.Androl* 31:325-330
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J Cancer* 26:239-257
- Kotwicka M, Filipiak K, Jdrzejczak P, Warchol JB (2008) Caspase-3 activation and phosphatidylserine membrane translocation in human spermatozoa: is there a relationship? *Reprod.Biomed.Online.* 16:657-663
- Lee TH, Liu CH, Shih YT, Tsao HM, Huang CC, Chen HH, Lee MS (2010) Magnetic-activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility{dagger}. *Hum.Reprod.* 25:839-846
- Marchiani S, Tamburrino L, Maoggi A, Vannelli GB, Forti G, Baldi E, Muratori M (2007) Characterization of M540 bodies in human semen: evidence that they are apoptotic bodies. *Mol.Hum Reprod* 13:621-631
- Oehninger S, Morshedi M, Weng SL, Taylor S, Duran H, Beebe S (2003) Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa. *Reproductive Biomedicine Online* 7:469-476
- Paasch U, Grunewald S, Agarwal A, Glandera HJ (2004a) Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil.Steril.* 81 Suppl 1:802-809
- Paasch U, Grunewald S, Dathe S, Glander HJ (2004b) Mitochondria of human Spermatozoa are preferentially susceptible to apoptosis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1030:403-409
- Paasch U, Grunewald S, Fitzl G, Glander HJ (2003) Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. *J.Androl* 24:246-252
- Perticarari S, Ricci G, Boscolo R, De SM, Pagnini G, Martinelli M, Presani G (2008) Fas receptor is not present on ejaculated human sperm. *Hum.Reprod.* 23:1271-1279
- Rawe VY, Boudri HU, Sedo CA, Carro M, Papier S, Nodar F (2010) Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. *Reprod. Biomed.Online.* 20:320-323
- Said TM, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Baumann T, Kriegel C, Li L, Glander HJ, Thomas AJ, Jr., Paasch U (2006) Selection of

nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. *Biol Reprod* 74:530-537

Said TM, Grunewald S, Paasch U, Glander HJ, Baumann T, Kriegel C, Li L, Agarwal A (2005a) Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. *Reprod Biomed Online* 10:740-746

Said TM, Grunewald S, Paasch U, Rasch M, Agarwal A, Glander HJ (2005b) Effects of magnetic-activated cell sorting on sperm motility and cryosurvival rates. *Fertil. Steril.* 83:1442-1446

Salvesen GS, Dixit VM (1997) Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91:443-446

Schuffner A, Morshedi M, Oehninger S (2001) Cryopreservation of fractionated, highly motile human spermatozoa: effect on membrane phosphatidylserine externalization and lipid peroxidation. *Hum.Reprod* 16:2148-2153

Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, Schlegel PN, Howards SS, Nehra A, Damewood MD, Overstreet JW, Sadovsky R (2002) Best practice policies for male infertility. *Fertil.Steril.* 77:873-882

Shen HM, Dai J, Chia SE, Lim A, Ong CN (2002) Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum.Reprod* 17:1266-1273

Sion B, Janny L, Boucher D, Grizard G (2004) Annexin V binding to plasma membrane predicts the quality of human cryopreserved spermatozoa. *International Journal of Andrology* 27:108-114

van Heerde WL, de Groot PG, Reutelingsperger CP (1995) The complexity of the phospholipid binding protein Annexin V. *Thromb.Haemost.* 73:172-179

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger CP (1995) A novel assay for apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression of early

apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol.Methods* 184:39-51

von Schonfeldt V, Krishnamurthy H, Foppiani L, Schlatt S (1999) Magnetic cell sorting is a fast and effective method of enriching viable spermatogonia from Djungarian hamster, mouse, and marmoset monkey testes. *Biol Reprod* 61:582-589

Wang X, Sharma RK, Gupta A, George V, Thomas AJ, Falcone T, Agarwal A (2003) Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. *Fertil Steril* 80 Suppl 2:844-850

World Health Organization (2010) WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen 5th edition.

Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A (2008) Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum.Reprod.* 23:2663-2668

NUEVAS TÉCNICAS DE SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES: SELECCIÓN MEDIANTE IMSI

Manuela Alonso Nieto
IVI Madrid
e-mail: ivimadrid@ivi.es

INTRODUCCIÓN

La técnica más utilizada de inseminación en todos los centros IVI es la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI). Esta técnica permite la observación morfológica tanto del ovocito como del espermatozoide a un aumento máximo de 400x. La capacidad de observación de la morfología espermática a 400x puede ser insuficiente, llegando a discernir únicamente características morfológicas graves como dobles colas, dobles cabezas, globozoospermia, megalozoospermia, etc.

En la actualidad varios grupos están utilizando un nuevo método de selección de espermatozoides, introducido por Bartoov et al. (2002), que permite la observación de la morfología del núcleo espermático, y que se denomina "Examen morfológico

de los orgánulos del espermatozoide móvil a grandes aumentos" (high magnification motile sperm organellar morphology examination, MSOME), la magnificación que utiliza está entre 6000X y 13500X aumentos.

Posteriormente el mismo grupo introdujo el IMSI (inyección intracitoplasmática del espermatozoide móvil seleccionado morfológicamente) (Bartoov et al., 2003), que permite, además de acceder a la observación de la morfología fina del núcleo espermático a tiempo real, seleccionar con estos aumentos el espermatozoide que va a ser microinyectado en el ovocito. Este estudio muestra una mayor tasa de gestación e implantación, y una menor tasa de aborto temprano espontáneo, en parejas con 2 o más ciclos fallidos y sémenes teratozoospermicos moderados. La conclusión es que el desarrollo temprano del embrión está

asociado a la morfología nuclear del espermatozoide.

A raíz de estos datos han aparecido varios grupos como los de Antinori et al. (2007), o Vanderzwalmen et al. (2007, 2008), mostrando resultados espectaculares de gestación e implantación con esta nueva técnica, en parejas que tenían varios ciclos fallidos de reproducción asistida. Uno de los inconvenientes de estos trabajos es que todas las comparaciones se han hecho relacionando los resultados de la IMSI con los resultados retrospectivos de ciclos anteriores de ICSI.

En este estudio se pretende determinar si el desarrollo embrionario temprano, en D2 y D3, así como el de blastocistos, se ve comprometido por la morfología fina del núcleo espermático elegido en el momento de la microinyección. Para ello se utilizará la IMSI, en la que se

elegirá el espermatozoide utilizando la clasificación MSOME; y la ICSI en la que se elige el espermatozoide morfológicamente pero con menos aumentos. Ambas técnicas se realizarán en ovocitos de donante, siendo la cohorte utilizada para cada técnica elegida al azar. Todos los ciclos se iniciarán como cultivo secuencial, siguiendo los criterios del laboratorio de FIV. Las transferencias se harán en estadio de blastocisto (D5 o D6), excepto en aquellos casos en los que el número de fecundados sea menor de 6 o que haya menos de 6 embriones de calidad aceptable en D3, en cuyo caso se haría la transferencia el mismo D3. Al ser ovocitos de donante, la calidad de éstos no tiene porqué estar comprometida y al realizar la misma técnica en todos los ovocitos obtenemos transferencias puras de ambas técnicas, lo que nos permite comparar los resultados de gestación, implantación y aborto temprano; además de la calidad embrionaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trata de un estudio prospectivo randomizado de carácter experimental para determinar la validez de un método de selección de espermatozoides antes de su inyección en el interior del ovocito.

LA POBLACIÓN EN ESTUDIO

Parejas en ciclos de ovodonación (donaciones mayores o iguales a 10 ovocitos MII frescos) y cuya muestra de semen haya sido diagnosticada de teratozoospermia.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Parejas en ciclos de ovodonación. Con donaciones mayores o iguales a 10 ovocitos MII frescos cuya muestra de semen sea teratozoospermica.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Parejas que no sean de ovodonación
- Parejas de ovodonación con donaciones menores a 10 ovocitos MII.
- Parejas de ovodonación de ovocitos vitrificados.
- Parejas de ovodonación con muestras de semen diagnosticadas como oligozoospermia severa con una concentración menor a 10×10^6 de

espermatozoides por mililitro o astenozoospermia moderada con una movilidad inferior a 30% de espermatozoides móviles progresivos.

TAMAÑO MUESTRAL

100 ciclos de ovodonación con las características antes indicadas.

GRUPOS DE ESTUDIO

Mujeres incluidas en el programa de donación de ovocitos sometidas a una terapia hormonal sustitutiva.

Las parejas irán distribuidas en 2 grupos determinados al azar:

- El grupo 1 ovodonaciones destinadas a la técnica de IMSI.
- El grupo 2 ovodonaciones destinadas a la técnica de ICSI.

VARIABLES A COMPARAR EN CADA GRUPO

- % de ovocitos fecundados
- Número de blastómeras en D2 y D3
- % de fragmentación en D2 y D3
- Tipo de fragmentación en D2 y D3
- Simetría de las blastómeras en D2 y D3
- Existencia de multinucleación en D2 y D3
- Estadio y grado de expansión de los blastocistos
- Tipo de la masa celular interna y trofoectodermo en los blastocistos
- Porcentaje de gestación con embriones transferidos de ICSI
- Porcentaje de gestación con embriones transferidos de IMSI
- Tasa de implantación con embriones transferidos de ICSI
- Tasa de implantación con embriones transferidos de IMSI
- Porcentaje de aborto temprano con embriones transferidos de ICSI
- Porcentaje de aborto temprano con embriones transferidos de IMSI

RESULTADOS

Se presentarán en el congreso

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal A, Gupta S, Sharma RK 2005 Oxidative stress and its implication in female infertility – a clinician's perspective. *Reproductive BioMedicine Online* 11, 641–650.

Antinori M., Licata E., Dani G., Cerusico F., Versaci C., d'Angelo D., Antinori S. 2007 Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reproductive BioMedicine Online* 16 No 6. 835-841

Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y, Barak Y. 2002 Relationship between human sperm subtle morphological characteristics and IVF-ICSI outcome. *J Androl*;23:1–8.

Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F et al. 2003 Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertility and Sterility* 80, 1413–1419.

Berkovitz A, Eltes F, Yaari S et al. 2005 The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Human Reproduction* 20, 185–190.

Berkovitz A, Eltes F, Lederman H et al. 2006a How to improve IVF-ICSI outcome by sperm injection? *Reproductive BioMedicine Online* 12, 634–638.

Cayli S, Jakab A, Ovari L et al. 2003 Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. *Reproductive BioMedicine Online* 7, 462–468.

Dalzell LH, McVicar CM, McClure N, Lutton D, Lewis SE. 2004 Effects of short and long incubations on DNA fragmentation of testicular sperm. *Fertil Steril*;82:1443–5.

De Vos A, Van De Velde H, Joris H et al. 2003 Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* 79, 42–48. Greco E, Iacobelli M, Rienzi L et al. 2005^a

Garolla A, Fortini D, Menegazzo M, De Toni L, Nicoletti V, Moretti A, Selice R, Engl B, Foresta C. 2008 High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. *Reproductive BioMedicine Online* 17(5):610-6

Hammadeh ME, Strehler E, Zeginiadou T, Rosenbaum P, Schmidt W. 2001 Chromatin decondensation of human sperm in vitro and its relation to fertilization rate after ICSI. *Arch Androl* ;47:83–7.

Mansour RT, Aboulghar MA, Serour GI et al. 1995 The effect of sperm parameters on the

outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* **64**, 982–986.

Nagy ZP, Liu J, Joris H et al. 1995 The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the basic sperm parameters. *Human Reproduction* **10**, 1123–1129.

Oehninger S, Chaturvedi S, Toner J, Morshedi M, Mayer J, Lanzendorf S, Muasher S. Semen quality: is there a paternal effect on pregnancy outcome in in-vitro fertilization/ intracytoplasmic sperm injection? *Hum Reprod.* 1998;13:2161–2164.

Parinaud J, Mieuisset R, Vieitez G et al. 1993 Influence of sperm parameters on embryo quality. *Fertility and Sterility* **60**, 888–892.

Peer S, Eltes F, Berkovitz A, Yehuda R, Itsykson P, Bartoov B. 2007 Is fine morphology of the human sperm nuclei affected by in vitro incubation at 37 degrees C? *Fertil Steril* 88(6):1589–94. Epub 2007

Sakkas D, Seli E, Bizzaro D et al. 2003 Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reproductive BioMedicine Online* **7**, 428–432.

Shoukir Y, Chardonens D, Campana A, Sakkas D 1998 Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? *Human Reproduction* **13**, 1632–1637.

Sukcharoen N, Sithipravej T, Promviegchai S et al. 1998 Sperm morphology evaluated by computer (IVOS) cannot predict the fertilization rate in vitro after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* **69**, 564–568. Svalander P, Jakobsson AH, Forsberg AS.

Tesarik J, Greco E, Mendoza C 2002 Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Human Reproduction* **17**, 184–189.

Tesarik J, Greco E, Mendoza C 2004 Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Human Reproduction* **19**, 611–615.

Tesarik J 2005 Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. *Reproductive BioMedicine Online* **10**, 370–375.

Vanderzwalmen P, Bach M. and Zech N. 2007. Selection of the best spermatozoa at high magnification: Can we consider intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) as the new generation of ICSI? ASEBIR Congress 2007.

Vanderzwalmen P, Hiemer A., Rubner P, Bach M., Neyer A., Stecher A., Uher P., Zintz M., Lejeune B., Vanderzwalmen S, Cassuto G, Zech NH. 2008 Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles *Reproductive BioMedicine Online* **17** No 5., 617–627.

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 espermatozoides, cultivo de embriones, criopreservación y Maduración In Vitro de ovocitos.

MediCult le ofrece calidad de producto, servicio e innovación.



MediCult España S.L.

Gran Via 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

ESTADO ACTUAL DEL GRUPO DE INTERÉS DE EMBRIOLOGÍA

M^a José De los Santos

El Grupo de Interés presentará la actualidad del trabajo realizado, los proyectos en marcha y las propuestas de futuro del grupo.

NON-INVASIVE DIAGNOSIS OF EMBRYO SELECTION TECHNIQUES (TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO NO INVASIVO DE SELECCIÓN EMBRIONARIA)

Mark G Larman¹, Petra Wale², Rebecca Collins³, Michelle Lane⁴, David K Gardner²

¹Vitrolife, 3601 South Inca St, Englewood, CO 80110, USA

²Dept of Zoology, University of Melbourne, Parkville, VIC 3010, Australia

³Repromed, Dulwich, Adelaide, Australia

e-mail: mlarman@vitrolife.com

INTRODUCTION

The ultimate goal of human IVF is the birth of a healthy singleton child following the transfer of a single embryo. To attain the routine transfer of a single embryo requires both the appropriate culture system to maintain development of the embryo, and the ability to determine, non-invasively, the viability of each embryo within a patient's cohort. Analysis of embryo nutrition has enabled the development of more physiological media, but now it is helping to identify biomarkers of developmental potential.

From fertilisation to implantation the human preimplantation embryo has limited endogenous energy stores, and consequently obtains its nutrition from the surrounding fluids within the oviduct and uterus. As the embryo passes through the female reproductive tract it is exposed to gradients of nutrients. Within the oviduct the embryo is exposed to relatively high levels of pyruvate and lactate, but low levels of glucose. In contrast, the uterine environment provides more glucose and significantly less pyruvate and lactate. Furthermore, the fluids within the reproductive tract contain significant levels of certain amino acids, together with changing levels of glycosaminoglycans. Finally, it is also evident that a complex dialogue takes place between the embryo and the mother through complex signaling pathways involving cytokines (including chemokines) and growth factors, the modes of which are still to be elucidated.

During the preimplantation period the embryo undergoes significant changes in gene expression patterns, as the embryonic genome is gradually activated, and in physiology as it develops and differentiates. Underlying such changes are fundamental differences in nutrient requirements and energy metabolism of the embryo. Of significance, the nutrient requirements of the embryo are mirrored by the gradient of nutrients within the female reproductive tract.

The pronucleate oocyte and cleavage stage embryo are metabolically quiescent. Consequently there is limited demand for biosynthesis and energy requirements remain low, hence glucose is not utilised for energy production. Rather the energy demands during the first 48h of life are met predominantly by pyruvate and lactate, although specific amino acids are involved in nutrient utilisation and metabolic regulation. From the 8-cell stage onwards, as cell numbers increase exponentially and the embryo undergoes morphological changes at compaction and subsequently the generation of a blastocoel, there is an increased need and demand for glucose as a nutrient.

Of interest, male and female preimplantation mammalian embryos differ not only in their chromosomal complement, but in their proteome and subsequent metabolome. This phenomenon is due to a finite period during preimplantation development when both X-chromosomes in the female embryo are active, between

embryonic genome activation and X-chromosome inactivation, around the blastocyst stage. Consequently, prior to implantation male and female embryos exhibit differences in their cellular phenotype. Manifestations of such differences include altered total activity of specific X-linked enzymes and the metabolic pathways they regulate. Subsequently, one would expect to be able to determine differences in the rate of consumption and utilisation of specific nutrients between male and female embryos (Gardner et al., 2010). A recent study by Sturmey and colleagues (Sturmey *et al.*, 2010) has demonstrated a difference in the uptake of seven amino acids between male and female bovine blastocysts cultured in vitro. Additionally Pickton et al. (2010) observed that gender significantly affected the metabolism of certain amino acids by cleavage stage human embryos.

The relationship between embryo nutrition and viability has been documented for three decades. However, the technologies required for the analysis of such limited amounts of biological material has been highly sophisticated and confined to a few laboratories. Hence this approach has not been adopted by clinical IVF. With the advent of novel and more sensitive analytical platforms, the quantification of nutrient utilisation is finally being applied in clinical studies. Data to date from such work indicate that both the utilisation of specific carbohydrates and amino acids is associated with

pregnancy outcome. Significantly, all such studies are completely non-invasive, requiring only small volumes of spent culture medium for analysis.

As well as the analysis of specific nutrients, metabolomic technologies are being used to quantitate the overall metabolic footprint by employing variants of optical spectroscopy including Raman and Near Infrared (NIR) methods. Such methods have previously dominated biospectroscopy, because of their efficiency, sensitivity and amenability to milli- and micro-scale volumes. Seli and colleagues (2007) were the first to report comparisons of metabolomic embryo profiles obtained from spent culture medium using both techniques, and found strong correlations between pregnancy outcomes. The validity of such a metabolomics approach is currently being evaluated prospectively.

A study included in this presentation by Gardner and colleagues (2011) has also observed sex-specific differences in the uptake of glucose by human embryos post compaction. Furthermore, glucose consumption by embryos that resulted in a pregnancy was significantly higher on both day 4 and day 5 than those embryos that failed to develop post transfer.

MATERIALS AND METHODS

The embryos of 50 patients having single blastocyst transfer were cultured individually from day 3 in 10µl drops of medium G2 (Vitrolife) under Ovoil (Vitrolife) in 5%O₂, 6%CO₂, 89%N₂. Embryos were moved to fresh drops of medium every 24h. Spent media samples, including controls containing no embryo, were coded, frozen and subsequently analysed blind. Analysis of glucose was performed using enzyme linked reactions and quantitative fluorescence microscopy (Leese et al., 1984; Gardner, 2007).

RESULTS

Of the 50 patients having a single blastocyst transferred, 32 had a positive hCG (64%) and 29 resulted in a fetal heart beat (58% implantation rate). Twenty eight children were subsequently born (56% live birth rate) of which 13 were boys

and 15 were girls. Glucose consumption by embryos that continued on to establish a pregnancy was significantly higher on both culture day 4 (82.0 ± 4.9 pmol/embryo/h) and day 5 (182.1 ± 20.6 pmol/embryo/h) compared to those embryos which failed to develop post transfer (50.3 ± 4.4 and 90.8 ± 11.6 pmol/embryo/h respectively) (Figure 1). Furthermore, on day 4 there was a significant difference (28% increase) in glucose uptake by females (92.5 ± 7.1 pmol/embryo/h) compared to males (72.0 ± 6.3 pmol/embryo/h). By day 5 the difference between males and females was reduced to 19% and was not significantly different. The overall glucose consumption over the 48h period from day 3 to day 5 was 131.0 ± 11.4 pmol/embryo/h for those embryos which subsequently implanted, compared

to 72.1 ± 7.3 pmol/embryo/h for those which failed to develop post transfer.

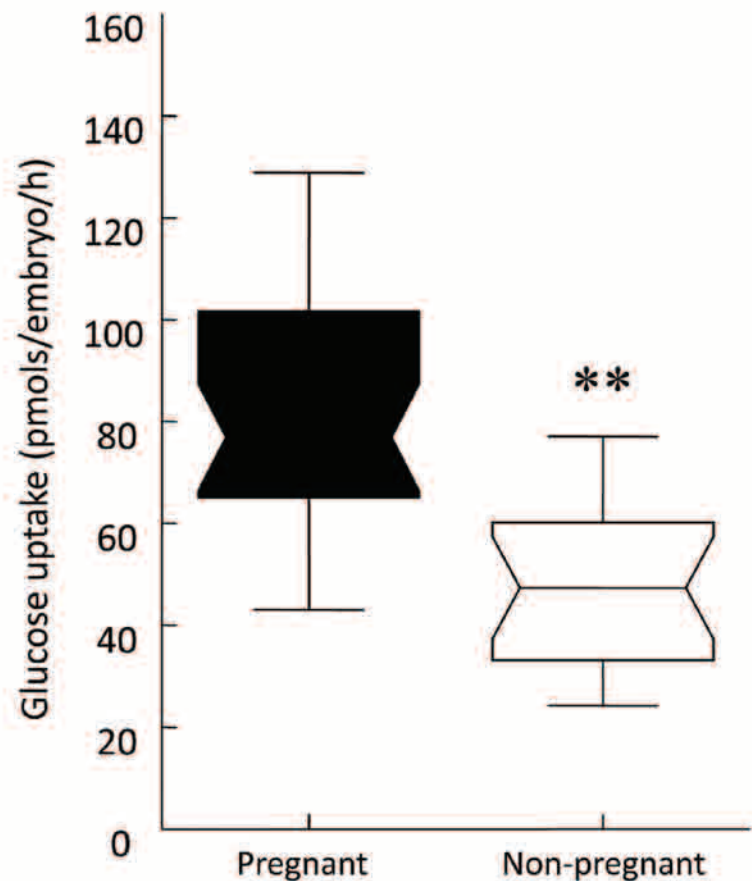
CONCLUSION

The data presented here indicate that on day 4 and day 5 of development there is a positive correlation with glucose uptake and human embryo viability, and that furthermore, there are differences in the metabolism of male and female embryos. Prospective randomized trials are now required to evaluate the merits of metabolic criteria for human embryo selection.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the staff and patients of Repromed, Adelaide. This work was funded by the University of Melbourne.

Figure 1



REFERENCES

Gardner DK (2007). Non-invasive metabolic assessment of single cells. *Methods Mol Med*: 132,1-9.

Gardner DK, Larman MG and Thouas GT (2010) Sex-related physiology of the preimplantation embryo. *Mol Hum Reprod* 16: 539–547.

Gardner DK, Wale P, Collins R and Lane M (2011) Glucose consumption of single post-compaction human embryos is

predictive of embryo sex and live-birth outcome. *Hum Reprod*. in press.

Leese HJ and Barton AM (1984) Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *J ReprodFertil*: 72,9-13.

Picton HM, Elder K, Houghton FD, Hawkhead JA, Rutherford AJ, Hogg JE, Leese HJ, Harris SE (2010) Association between amino acid turnover and chromosome aneuploidy during human preimplantation embryo development in vitro. *Mol Hum Reprod*. 16:557-69.

Seli E, Sakkas D, Scott R, Kwok SC, Rosendahl SM, Burns DH (2007) Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 88: 1350-7.

Sturmey RG, Bermejo-Alvarez P, Gutierrez-Adan A, Rizos D, Leese HJ, Lonergan P (2010) Amino acid metabolism of bovine blastocysts: a biomarker of sex and viability. *Mol Reprod Dev* 77:285–296.

USO EN EL LABORATORIO DE LA CATALOGACIÓN EMBRIONARIA DE ASEBIR. ESTADO ACTUAL

M^a Victoria Hurtado de Mendoza
Centro Mas Vida Reproducción. Sevilla
e-mail: victoria.hurtado@masvidareproduccion.com

INTRODUCCIÓN

La gran discrepancia entre los centros de reproducción asistida, tanto internacionales como nacionales, en un aspecto básico de la embriología clínica como es la clasificación embrionaria y la imposibilidad de generar estudios multicéntricos con valores de calidad embrionaria, interpretar informes clínicos de laboratorios externos o comparar los datos bibliográficos, dio lugar a la formación de una Comisión de trabajo ASEBIR, en el año 2004, que bajo el enunciado: "Definición de criterios de valoración morfológica y su caracterización, de ovocito a blastocisto" se marcó como objetivo la unificación y el consenso sobre los parámetros más sobresalientes para determinar una correcta y eficaz clasificación. Para ello, como todos sabéis, Manuel Ardoy y Gloria Calderón fueron los encargados de la organización y coordinación del trabajo junto a 10 embriólogos de diversos centros de España. Se realizó una exhaustiva revisión bibliográfica, una encuesta multicéntrica y se contó con la experiencia de los miembros de la comisión. La propuesta de los criterios morfológicos para cada estadio fue presentada por M^a José Torelló en el 3er Congreso ASEBIR (2005). Posteriormente, en el Congreso

Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad en Zaragoza 2006, MJ Torelló y colaboradores presentaron la clasificación embrionaria y su utilidad a fin de elegir el mejor embrión, reducir los embarazos múltiples e intentar unificar criterios a la hora de expresar resultados (Torelló et al., 2006). La materialización de todo este trabajo de la Comisión se recogió en la publicación dentro de los Cuadernos de Embriología Clínica editado por ASEBIR bajo el título "Criterios de Valoración Morfológicos de Oocitos, Embriones tempranos y Blastocistos Humanos" (2007) en una primera edición y en el 2008 se realizó una segunda edición revisada. Posteriormente, con la finalidad de dar a conocer este trabajo en otras sociedades científicas, se editó una versión en inglés.

En los sucesivos congresos de ASEBIR se han ido presentando actualizaciones de la clasificación, que por tratarse de un proceso dinámico no puede quedarse estancada. Jorge Ten, en el 4º Congreso ASEBIR (Ten, 2007) presentó: "Clasificación ASEBIR de la Calidad Embrionaria. Estado actual", donde se mostraban los primeros resultados de su aplicación en la práctica clínica en diferentes centros. Y Jorge Cuadros señalaba los proyectos futuros del

grupo de interés (Cuadros, 2007).

Una vez asentadas las bases, lo importante era que todos los centros aplicasen la clasificación ¿cómo fue la respuesta? Ya, ese mismo año, el 23% de los trabajos presentados en la sección Embriología en el Congreso de la SEF aplicaban criterios ASEBIR. Y las opiniones de los socios se manifestaban en la sección DEBATE de la revista ASEBIR Junio 2008, donde aparecían las primeras experiencias, la mayoría de ellas muy positivas: coincidían en que el periodo de familiarización con el manejo de los criterios ASEBIR era muy corto; se obtenía un mayor consenso entre los distintos embriólogos del centro; valoraban muy positivamente el seguimiento del embrión desde el principio de su desarrollo; se contemplaban aspectos que antes no se habían valorado como la presencia de vacuolas o alteraciones de la zona pelúcida, y la importancia de los tiempos exactos de observación (Hugas et al., 2008; Ferrando et al., 2008). Además, se apreciaba una tendencia a unificar criterios entre diversos centros que era bastante heterogénea (Cortés et al., 2008).

Por otro lado, se comentaban algunos puntos como negativos, por ejemplo que sólo clasifica embriones frescos, no congelados (Cortés et al., 2008); la

imposibilidad de promocionar un embrión de D+2 a D+3 y ¿por qué promocionaba un embrión si se le practicaba la eclosión asistida? ; se echaba de menos un score para ovocitos (Brossa et al., 2008). También había opiniones escépticas sobre la posibilidad de que los criterios ASEBIR se implantasen dada la gran diversidad de centros, pero animaban a seguir adelante (Mandiola, 2008). A lo largo de este tiempo se han ido sugiriendo algunos aspectos a tener en cuenta, con carácter complementario, como es la clasificación del patrón pronuclear (Brossa et al., 2010).

La Comisión de trabajo ASEBIR tenía claro que aún quedaba mucho por hacer y por ello solicitó a la Junta Directiva pasar a ser un Grupo de Interés Calidad Embrionaria, que no ha dejado de seguir profundizando e intentando corroborar con datos lo expuesto. Así en el V Congreso ASEBIR J. Cuadros expuso los resultados sobre la correlación de las tasas de implantación y categorías A, B, C, D de los embriones (Cuadros, 2009).

La difusión de la catalogación ha ido avanzando mediante la realización de Jornadas de Formación ASEBIR (2009; 2011) También hemos intentado su difusión a otras sociedades como ESHRE y ALPHA, por lo que la publicación fue traducida al inglés. Recientemente, a través de Gloria Calderón ASEBIR participó en la reunión de expertos a nivel mundial con el objetivo de llegar a un consenso de criterios mínimos en la evaluación de ovocitos y embriones, promovida por ALPHA (Alpha Executive) y el Grupo de Interés especial de Embriología de la ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology and Embryology Consensus Workshop on Embryo Assesment) celebrada en febrero de 2010 en Estambul (Join Alpha / ESHRE, 2010).

Por último, no podemos obviar la incorporación de metodologías no invasivas para la valoración morfológica del ovocito y el embrión, con el objetivo de mejorar la selección del embrión con mayor potencial de implantación. Algunos trabajos no sólo contemplan las características morfológicas del ovocito limitándose al complejo de las células del cúmulus, citoplasma ovocitario, corpúsculo polar, espacio perivitelino, zona pelúcida, sino que

incluyen, mediante la incorporación de la luz polarizada, la estructura del huso meiótico (Lasienè et al., 2009), si bien es cierto que de momento no hay un consenso claro en la bibliografía que determine ninguna característica morfológica concreta que pueda ser empleada como valor pronóstico (Rienzi et al., 2010).

Por otro lado, las observaciones en periodos de tiempo continuo (Wong et al., 2010) evidentemente dan más información que las observaciones puntuales a determinadas horas, pero son metodologías excesivamente caras y de momento poco prácticas para la rutina clínica. No obstante dejan en tela de juicio si las clasificaciones morfológicas tendrán futuro.

Todo lo expuesto nos ha hecho plantearnos desde el hoy Grupo de Interés de Embriología, y es el objetivo de este trabajo: desde que se presentaron las recomendaciones para la evaluación embrionaria ASEBIR hasta el día de hoy ¿Cuál es el uso actual de la catalogación ASEBIR en los laboratorios?

MATERIAL Y MÉTODOS

A fin de poder conocer el uso de la catalogación ASEBIR en los laboratorios FIV, se ha confeccionado una encuesta que de forma aleatoria se ha enviado a 82 centros de reproducción asistida, tanto en el ámbito privado como público, con gran volumen de trabajo o poco, de toda la geografía española. La encuesta consta de 23 preguntas o ítems, tanto abiertas como cerradas, en las que se intentaba obtener información general (ítems 1-4); si se realizan controles de calidad (ítems 5-9); cómo se valoran algunas características como la división temprana (ítems-13); la multinucleación (ítems 14-15); qué caracteres se valoran más en un embrión óptimo (ítem 16); la utilidad de los esquemas y tablas de la clasificación; el D+4; y se pedía opinión sobre qué aspectos parecían menos claros o pensaban que faltaban en la catalogación (ítems 17-22). Por último, si la aplicación de la clasificación ASEBIR había incrementado su tasa de implantación (ítem 23) ENCUESTA. Fig.1

El tratamiento estadístico en estos momentos todavía no se ha completado.

FIG.1. ENCUESTA

1.- Usas en el laboratorio los Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos?

SI NO

* Si es NO da una razón

2.- ¿Desde cuándo?

2007 2008
2009 2010

3.- ¿Tienen los clínicos de tu centro conocimiento de los criterios de ASEBIR?

SI NO

4.- ¿Te parece que recogen todos los aspectos fundamentales de una catalogación?

SI NO

* Si es NO da una razón

5.- ¿Hay varios observadores en tu centro de la calidad embrionaria?

SI NO

6.- ¿Qué diferencia inter-observador a la hora de catalogar los embriones habéis apreciado?

5% 10% 15%
No se ha valorado

7.- ¿Qué diferencia mínima de porcentaje de restos citoplasmáticos crees que eres capaz de distinguir?

A) Creo que puedo distinguir un embrión con un 10% de restos de otro con un 30% de restos

B) Creo que puedo distinguir un embrión con un 10% de restos de otro con un 20% de restos

C) Creo que puedo distinguir un embrión con un 10% de restos de otro con un 15% de restos

D) Creo que puedo distinguir un embrión con un 10% de restos de otro con un 12% de restos

E) Creo que puedo distinguir un embrión con un 10% de restos de otro con un 11% de restos

8.- ¿Realizáis algún control externo?

SI NO

Explica sus características

9.- ¿Realizáis algún control interno?

SI NO

Explica en que consiste

10.- Se siguen en tu centro los tiempos de chequeo indicados en los criterios ASEBIR para la evaluación embrionaria?

Fecundación: 16-22h postinseminación

D+2: 44-47h postinseminación

D+3: 67-71h postinseminación

SI NO

* Si es NO da una razón

11.- Realizas el chequeo de división temprana?

25h 26h 27h >27h NO

12.- ¿Concedes algún valor a borrar pronúcleos entre 25-27h?

SI NO

13.- ¿Es determinante la división temprana para la selección del embrión a transferir?

SI NO

14.- ¿Cuándo es determinante para ti la multinucleación de una blastómera para descartar el embrión a transferir?

División Temprana

D+2

D+3

Cualquier Momento

15.- ¿A partir de qué grado de multinucleación se rechaza un embrión a transferir, caso de existir únicamente embriones multinucleados?

Micronucleación: Embrión con una blastómera con más de dos núcleos

Binucleación: Embrión con una blastómera con dos núcleos

Multinucleación: Embrión con más de una blastómera micro o binucleada

En cualquier caso

16.- ¿Qué criterios utilizas para definir a un embrión de óptima calidad?

(Da una puntuación de 1 a 10 a cada característica en función de la importancia que tiene para ti, siendo 10 la máxima puntuación)

- Ritmo de división

- Fragmentación (señala por orden de importancia)

· Porcentaje de fragmentación en

D+2 D+3

· Distribución de los fragmentos

Centrados Dispersos

· Tamaño de los fragmentos

- Presencia de vacuolas

Escasas Abundantes

- Multinucleación

- Simetría

- Zona pelúcida

Normal Densa

Delgada No circular

- Anillo Acitoplasmático

17.- ¿Qué parámetros de la clasificación de ASEBIR te parecen menos claros? Los referidos a

Oocitos Embriones D+1

Embriones D+2 Embriones D+3

Blastocistos

18.- ¿Utilizas las tablas del cuaderno para la clasificación embrionaria?

SI NO

19.- ¿Te resultan útiles los esquemas de gradación de la calidad embrionaria?

SI NO

*Si es NO da una razón

20.- ¿Crees necesario unos criterios ASEBIR para día+4?

SI NO

*Si es NO da una razón

21.- ¿Qué otros criterios o características embrionarias no incluidos crees que faltan?

22.- ¿Cuál crees que será el papel de los criterios de ASEBIR ante los sistemas automáticos de evaluación embrionaria?

23.- ¿Crees realmente que los criterios de ASEBIR han supuesto una mejora en tu tasa de implantación?

SI NO

*Si es NO da una razón

RESULTADOS

Dada la premura para entregar el resumen de la ponencia no se dispone de todos los datos tratados que serán presentados y desarrollados en el Congreso.

De los 82 centros consultados han respondido, tras 3 peticiones de envío, 36 centros (34 con nombre del centro y 2 no) y 8 correos han sido devueltos.

La inmensa mayoría de los centros afirma utilizar los criterios ASEBIR (88,8%) y prácticamente desde el principio, año 2007, el 43,7%. Los clínicos están al corriente de los criterios ASEBIR, únicamente en 3 centros la contestación fue NO. Los principios fundamentales que abarcan los criterios ASEBIR no

satisfacen a 2 centros, que consideran que se le da poca importancia a la multinucleación y al porcentaje de células multinucleadas, así como a la distribución de fragmentos.

Sólo en 6 centros la observación embrionaria la realiza un solo observador. Por problemas técnicos, la pregunta 6 sobre la diferencia interobservadores no ha sido respondida correctamente.

La pregunta 7 intentaba valorar qué porcentaje mínimo de fragmentos era capaz de distinguir el entrevistado. La gran mayoría (58,3%) distingue entre 10% y 30% y un 22,2% entre el 10% y 15%.

Respecto al uso de los controles externos sólo el 38,8% lo realizan, mientras que los controles internos lo realizan el 58,3% de los centros entrevistados y ambos controles, externos e internos, el 27,7%.

Los tiempos de observación recomendados por ASEBIR son seguidos por todos los centros salvo por 1.

La división temprana la realiza el 47,2% de los centros y le dan importancia a borrar pronúcleos justo el 50% de los mismos. Sin embargo, la división temprana no es determinante a la hora de seleccionar el embrión a transferir en el 72,2% de los grupos.

Respecto a la multinucleación, en cualquier momento en que se observa es un carácter desfavorable en el 52,7% de los centros, especialmente si se detecta en D+2 (36,1%). En la pregunta 15, se insistía ante el hipotético caso de contar sólo con embriones multinucleados, cómo lo valorarían, se observa que la multinucleación es el carácter decisivo para rechazar el embrión para la transferencia (61,1%), seguido por la micronucleación (22,2%), la aparición de más de un núcleo en la blastómera en cualquier estadio (3,2%) y la binucleación sería importante sólo para un centro.

En la Tabla I se encuentra la media del valor concedido a cada carácter del embrión óptimo (ritmo de división, fragmentación, multinucleación, presencia de vacuolas, etc.), así como el rango mínimo y máximo.

Tabla 1. Resultados de la valoración de las características de un embrión óptimo. Media \pm desviación estándar ($x \pm sd$). Rango mínimo -máximo

Carácter	$x \pm sd$	Min-máx
Ritmo de división	9.5 \pm 1.3	(5-10)
Fragmentación	8.6 \pm 1.31	(5-10)
Distribución	7.35 \pm 1.93	(2-10)**
Porcentaje D+2	8.33 \pm 1.33	(6-10)
Porcentaje D+3	8.75 \pm 1.29	(6-10)
Tamaño	7.85 \pm 1.88	(1-10)
Presencia de vacuolas	6.5 \pm 1.84	(2-10)
Escasas		
Abundantes	5.63 \pm 2.66	(1-10)
	7.80 \pm 2.25	(1-10)
Multinucleación	8.4 \pm 1.81	(3-10)
Simetría	7.72 \pm 1.93	(1-10)
Zona pelúcida	5.94 \pm 2.3	(1-10)*
Normal	7.00 \pm 2.44	
Densa	6.61 \pm 2.47	
Delgada	6.54 \pm 2.53	
No circular	6.82 \pm 2.50	
Anillo acitoplasmático	6.02 \pm 2.29	(1-10)*

*1 centro que no lo valora

* 2 centros que no lo valora

Los esquemas y tablas para facilitar la clasificación embrionaria según los criterios ASEBIR son empleados por el 75% y los consideran útiles (91,6%)

En cuanto a la evaluación embrionaria en D+4, el 30,5% de los grupos no la realiza y por lo tanto no la consideran necesaria.

Respecto a los aspectos menos claros, que, según los encuestados, necesitarían ser tratados con mayor detalle, son: la valoración en D+ 4 (34,2%) seguido por el D+ 3 (20%), una clasificación de los ovocitos (17%), el D+ 6 (5,7%), D+ 1 (2,8%). Un 20% no hace ninguna valoración o considera que los criterios de evaluación están bien. FIGURA 1



Gráfico 1. Criterios morfológicos que suscitan mayor interés.

Los aspectos no incluidos en los criterios y que los encuestados proponen son: calidad ovocitaria, revisar la multinucleación (grado, severidad y tipos); pronúcleos y precursores nucleolares; blastocistos; embriones congelados; división temprana, simetría y tamaño de blastómeros.

Los criterios ASEBIR frente a los sistemas automatizados no tienen una única respuesta, en general se consideran útiles si bien dependerán de los nuevos hallazgos.

Por último, en referencia a si el empleo de los criterios ASEBIR ha mejorado las tasas de implantación, el 58,3% reconocen que sí han incrementado su tasa de implantación.

DISCUSIÓN

La aplicación de los criterios ASEBIR en los laboratorios ha supuesto un esfuerzo por parte de todos, con la finalidad de unificar criterios. Muchos centros teníamos nuestros propios sistemas de evaluación embrionaria y, ante la perspectiva de cambiar, algunos no lo han hecho, otros los cambiaron sin más y otros realizaron pruebas comparativas, donde no encontraron una diferencia significativa; en el trabajo de Vanrell et al. (2007) la diferencia era un 6%.

Con objeto de conocer si se están aplicando los criterios ASEBIR, se realizó una encuesta de opinión sobre una muestra representativa de 82 centros con preguntas abiertas y cerradas. Las preguntas 1-4 intentaban recabar información general, así se constata que la gran mayoría de los centros consultados aplican los criterios ASEBIR; sólo 4 centros no lo hacen porque los consideran complicados, confusos, y no les aportan ventajas respecto a sus propios sistemas de clasificación embrionaria, si bien uno de los centros comenta que usa los criterios ASEBIR como apoyo. Desde la publicación de los criterios ASEBIR en el 2007, se ha ido extendiendo a lo largo de estos años su uso en los laboratorios dada su gran acogida. Para intentar valorar de qué forma se unifican los criterios entre los embriólogos de un mismo centro o entre distintos centros se realizaron las preguntas 5-9. La pregunta nº 6 de la encuesta pretendía determinar si se había realizado algún control en los centros sobre

la variabilidad intra e interobservador de la morfología embrionaria, entendiendo como la variabilidad interobservador la variación a la hora de asignar un grado a un mismo embrión cuando es evaluado por varios embriólogos y la variabilidad intraobservador a la variación al establecer un grado de un embrión cuando es evaluado por el mismo embriólogo en más de una ocasión. Lamentablemente, por problemas técnicos, esta información no pudo ser recogida. Sin embargo, bibliográficamente se ha descrito desde hace tiempo que la diferencia interobservadores puede ser alta, mientras que la intraobservador es moderada, y que pueden incidir sobre los resultados del programa de FIV/ICSI (Baxter Bendus et al., 2006). Por lo tanto, para unificar y acercar criterios a la hora de la evaluación, las diferentes sociedades científicas recomiendan la participación en controles externos para la evaluación embrionaria (*Practice Committee of American Society for Assisted Reproductive Medicine and Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology*, 2006; ASEBIR, 2008; Magli et al., 2008) y diversos trabajos realizados al respecto, si bien la bibliografía no es muy abundante, ponen de manifiesto que participar en controles de calidad externos disminuyen las diferencias entre laboratorios (Ruiz de Assín et al., 2008; 2009; Castilla et al., 2010). Así como el entrenamiento con imágenes hace que disminuyan las diferencias intra e inter observador (Arce et al., 2006; Paternot et al., 2009). Sin embargo, a pesar de las recomendaciones, sólo un 38,8% de los centros consultados realiza controles externos, de los cuales el 85,7% los realiza con el Centro de Estudio e Investigación de la Fertilidad (Ceifer), centro pionero en nuestro país, auspiciado por ASEBIR (Castilla et al. 2003). Un centro lo hace a través de la ESHRE y otro con Fertaid (Australia)

En las preguntas 10-13 la idea era conocer cómo se valoran los tiempos de observación y la división temprana en los diversos centros. Como todos sabemos, uno de los aspectos más importantes a la hora de realizar la valoración de la morfología embrionaria es el respetar los tiempos de observación, y esto es seguido por todos los centros consultados excepto uno. No llega a la mitad el porcentaje de centros que realizan la observación de la

división temprana y, de los que la realizan, el 76,4% también le conceden importancia a la rotura de pronúcleos. Sin embargo, un valor determinante de este parámetro a la hora de seleccionar el embrión a transferir, únicamente se lo confiere el 58,8%. En la bibliografía, trabajos recientes encuentran que la división temprana es un marcador independiente del potencial de implantación, mejor que la morfología del cigoto (Brezinova et al., 2009), y otros autores otorgan más valor predictivo a otro tipo de caracteres como el número de blastómeros, las características morfológicas y el grado (Nicoli et al., 2011). A fin de valorar la división temprana, como un potencial marcador de implantación, se han venido realizando por parte de la Comisión y actualmente por el Grupo de Interés de Embriología, revisiones bibliográficas que permitiesen un resultado concluyente, pero no se ha podido tomar una decisión. Recientemente, desde el grupo de interés se está llevando a cabo un estudio multicéntrico sobre la división temprana, cuyos datos se están procesando y esperamos poder presentar en nuestro próximo congreso.

La multinucleación (preguntas 14-15) es uno de los caracteres que más inquietud produce entre los encuestados, a pesar de estar documentado bibliográficamente que la presencia de dos o más núcleos o micronúcleos en una célula está correlacionado directamente con alta tasa de anomalías cromosómicas y bajas tasas de implantación (Van Royen et al., 2003). Según la catalogación ASEBIR, un embrión con multinucleación es categoría D; sin embargo, es uno de los caracteres morfológicos al que más referencia se hace en diversos *items*. Según los encuestados, las consideraciones de los criterios ASEBIR son incompletas, p.e. no se define qué porcentaje de multinucleación podría ser aceptable. Es cierto que hay referencias de niños nacidos transfiriendo embriones multinucleados, pero evitar la multinucleación es la recomendación. La consulta realizada sobre en qué momento se descarta un embrión para transferencia, el 52,7% responde que en cualquier momento; el 36,1% en D+2 y el 11,1% en D+3. En caso de no disponer nada más que de embriones multinucleados, por orden de importancia se rechazaría: aquel con multinucleación; micronucleación; en cualquier caso y, por último, binucleación.

Presuponemos que sabemos elegir un embrión óptimo, y con la finalidad de saber hasta qué punto estamos de acuerdo, se realizaron las preguntas y subpreguntas en el ítem 16. Hay determinados caracteres en los que hay acuerdo, como un buen ritmo de división, la baja fragmentación, la ausencia de vacuolas, sin multinucleación; sabemos lo que queremos, pero a la vista de las respuestas hay una gran dispersión en la valoración de determinados caracteres, como son la distribución y el tamaño de los fragmentos; la presencia de vacuolas; la simetría y la zona pelúcida. Estas discrepancias van a influir a la hora de catalogar los embriones como A, B, C o D y por lo tanto en la decisión clínica. La gran variabilidad a la hora de valorar estos caracteres hace pensar que sería deseable, como ya se comentó al principio de la discusión, la realización de controles externos e internos de calidad embrionaria, así como animar a ASEBIR a realizar mayor número de cursos y/o jornadas para aclarar y eliminar ciertas discrepancias, uniformizando los criterios y que el futuro del embrión no dependa del laboratorio donde se ha generado (Castilla, 2009).

Los esquemas y tablas que acompañan la clasificación morfológica ASEBIR son útiles (ítems 17,18 y 23), y se utilizan de forma habitual para catalogar los embriones. Si bien hay que resaltar que no hay concordancia en las respuestas, ya que dentro del grupo de aquellos que han contestado que no usan el cuaderno, el 77,7% sin embargo lo considera útil. Y dentro del grupo de los que usan el cuaderno, sólo 1 no lo considera útil. En cuanto a si esta catalogación ha supuesto un incremento en la tasa de implantación, un 58,3% de los centros ha contestado que sí. Los que han contestado que no, alegan que sus propios sistemas de catalogación son muy similares a los de ASEBIR, por lo cual no les ha supuesto una diferencia significativa en cuanto a sus tasas de implantación.

A pesar de la buena acogida y empleo de los criterios, hay ciertos aspectos en los que los encuestados desearían disponer de mayor información (ítems 19-21) y por orden de importancia serían: la valoración morfológica en D+4, si bien es cierto que el 30,5% no evalúa este estadio, quizá debido a que las transferencias embrionarias se llevan a cabo en D+3 con

mayor frecuencia que en D+5; la valoración morfológica en D+3; la valoración de la morfología de ovocitos; blastocistos en D+6; y por último la valoración en D+1. En referencia a los blastocistos, el Grupo de Interés de Embriología está trabajando en este sentido, realizando un estudio multicéntrico sobre la valoración morfológica de los blastocistos, y este mismo año ha sido el tema tratado, con gran éxito de asistencia, en la II Jornada de Formación bajo el título: "Uso clínico del blastocisto en Fecundación in vitro" (Jornada ASEBIR, 2011).

Por otro lado, otras valoraciones que consideran que se deberían incluir son: a) el grado de multinucleación; ha sido mencionado con insistencia en varios apartados, se requiere información sobre qué porcentaje es aceptable de blastómeros con multinucleación, determinar realmente si es tan importante ya que algunos opinan que se le da demasiada importancia, etc.; b) clasificación para embriones congelados, es una de las primeras propuestas realizadas cuando aparecieron los criterios ASEBIR y aún no se ha abordado; c) tratar con más detalle las observaciones en D+4, D+5, D+6; el desarrollo embrionario del D+4 al D+6 está esquematizado en la catalogación ASEBIR, de hecho fue revisado y actualizado, pero puede que el hecho de que el cultivo extendido a estos estadios no lo realicen todos los centros puede dar lugar a que exista un mayor desconocimiento; d) calidad ovocitaria, incluyendo la valoración del dimorfismo de los ovocitos durante la microinyección (resistencia/elasticidad de la membrana; formación del cono; la viscosidad del citoplasma).

Frente a la aparición de nuevas técnicas no invasivas como las "ómicas", el sistema de monitorización del embrión mediante observación ininterrumpida (Embryoscope, Unisense Fertil Tech A/S, Dinamarca) o analizadores de imágenes automáticas por periodos de tiempo (Wong et al., 2010) o, por el contrario, los que abogan por un solo análisis en D+3 (Racowsky et al., 2009), se podría pensar que los criterios ASEBIR pueden quedar desfasados en poco tiempo. Sin embargo, la respuesta (ítem 22) ha sido bastante positiva, puesto que la mayoría de los laboratorios considera que seguirán siendo válidos. Entre otras cosas, porque está por demostrar la potencia predictiva

de las nuevas tecnologías no invasivas y que no todos los centros tendrán fácil acceso a ellas. No obstante, la información obtenida a través de las nuevas tecnologías no invasivas es de esperar que dé mayor información y permita aclarar algunas controversias en nuestro sistema de graduación, p.e. definir mejor la catalogación entre embriones B y C.

CONCLUSIONES

- El uso de los criterios ASEBIR está muy extendido en los diversos laboratorios que consideran que recoge los aspectos fundamentales en la evaluación embrionaria.
- La aplicación de los criterios ASEBIR permite no sólo un mayor entendimiento entre los miembros de un mismo centro, sino entre los diferentes centros, reduciendo las diferencias intra e interobservadores.
- Se recomienda:
 - La participación en controles de calidad externos e internos.
 - Formación continuada mediante la realización de cursos o jornadas a fin de ir unificando los criterios.
 - La participación en trabajos multicéntricos que permitirán dar potencia a los criterios de ASEBIR.
- Hay aspectos de los que se demanda una información con mayor detalle, como la multinucleación, una valoración para ovocitos, embriones D+4 a blastocisto, entre otros.
- Al ser un sistema dinámico, los criterios han de estar en continua actualización, y la existencia de nuevas metodologías no invasivas no parece que vaya a hacer peligrar los fundamentos, si bien puedan dar lugar a algunas modificaciones.

AGRADECIMIENTOS

A José Luis del Pico Sánchez por su empeño en la elaboración de esta encuesta y su infinita paciencia. Asimismo, a todos y cada uno de los centros que han respondido a la encuesta y sin cuya colaboración no hubiera sido posible realizar este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arce JC, Ziebe S, Lundin K, Janssens R, Helmgard L, Sørensen P. Interobserver agreement and intraobserver reproducibility of embryo quality assessments. *Hum Reprod* 2006; 21 (8): 2141–2148.
- ASEBIR. Cuadernos de embriología clínica II. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. 2^a ed. Madrid: Góbal; 2008
- ASEBIR 1^a Jornada de Formación en Reproducción Asistida. Sevilla 15 de Mayo. 2009
- ASEBIR. Jornada ASEBIR de Formación. "Uso clínico del Blastocisto en Fecundación in vitro". Madrid 12 de Mayo. 2011
- Baxter Bendus AE, Mayer JF, Shipley SK, Catherino WH. Interobserver and intraobserver variation in day 3 embryo grading. *Fertil Steril* 2006; 86(6):1608-15.
- Brezinova J, Oborna I, Svobodova M, Fingerova H. Evaluation of day one embryo quality and IVF outcome—a comparison of two scoring systems. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009; (3): 7-9.
- Brossa M, Antich M, Blanch X. ¿Con cuál nos quedamos? *Rev. ASEBIR* 2008; 14 (1): 26
- Castilla A, Ortiz A, Magan R, Ortiz-Galisteo JR, González E, Aguilar J et al. Resultados de un ensayo piloto para un "Programa Nacional de control de calidad externo de laboratorio FIV". II Congreso ASEBIR, Granada, 2003. *Rev. ASEBIR* Diciembre 2003; 1(8): 40-44.
- Castilla JA. . Calidad Embrionaria. Catalogación ASEBIR. Casos prácticos, test de control de calidad. 1^a Jornada de Formación en Reproducción Asistida. Sevilla 15 de Mayo. 2009
- Castilla JA, Ruíz de Assin R, Gonzalvo MC, Clavero A, Ramírez JP, Vergara F, et al. External quality control embryology laboratories. *Reprod BioMed Online* 2010 (20):68-74
- Cortés JL, Ligeró G, Sánchez L, Nieto A, Bueno C, Montes R, et al. Criterios de valoración morfológicos de oocitos, preembriones tempranos y blastocistos humanos propuestos por ASEBIR. *Rev. ASEBIR* 2008; 14 (1): 10-13
- Cortés JL, Menéndez P. Evaluación de los criterios de valoración morfológicos de oocitos, preembriones tempranos y blastocistos humanos propuestos por ASEBIR. *Rev. ASEBIR* 2008; 14 (1): 25
- Cuadros, J. Proyectos de futuro del grupo de interés "calidad embrionaria". IV Congreso ASEBIR, Bilbao 2007. *Rev ASEBIR* 2007; 12(2): 24-26
- Cuadros, J. Estado actual del grupo de interés de Calidad Embrionaria. V Congreso ASEBIR. Valencia, 2009. *Rev ASEBIR* 2009; 14 (2): 8
- Ferrando, P. Criterios de valoración morfológicos de embriones ASEBIR. *Rev. ASEBIR* 2008; 14 (1): 25
- Hugas M, Fernández M, Sarquella J. Criterios de valoración morfológicos ASEBIR. Nuestra Experiencia. *Rev. ASEBIR* 2008; 14 (1): 24
- Join Alpha/ ESHRE. Consensus Workshop on Embryo Assessment. Stanadarization of grading morphology. *Fertil Steril* 2010; 94(3):1152-53
- Lasienė K, Vitkus A, Valanėiūtė A, Lasys V. Morphological criteria of oocyte quality *Medicina (Kaunas)* 2009; 45(7) - <http://medicina.kmu.lt>
- Magli MC, Van der Abbeel E, Lundin K et al., Revised guidelines for good practice of IVF laboratories. *Human Reproduction* 2008; 23: 1253-1262.
- Mandiola M ¿Sería conveniente generalizar la evaluación morfológica embrionaria de "asebir"? *Rev. ASEBIR* 2008; 14 (1):26
- Nicoli A, Capodanno F, Moscato L, Rondini I, Villani MT, Tuzio A et al., An analysis of pronuclear zygote configurations in 459 clinical pregnancies obtained with assisted reproductive technique procedures. *Reprod Biol Endocrinol* 2010, 8:77
- Paternot G, Devroey J, Debrock S, D'Hooghe TM, Spiessens C. Intra- and inter-observer analysis in the morphological assessment of early-stage embryos. *Reprod Biol Endocrinol* 2009, 7:105
- Practice Committee of American Society for Assisted Reproductive Medicine and Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology. Revised guideline for human embryology and andrology laboratories. *Fertil Steril* 2008; 90 (Suppl 3): 45-59
- Racowsky C, Ohno-Machado L, Kim J, Biggers JDb. Is there an advantage in scoring early embryos on more than one day? *Hum Reprod* 2009; 24 (9): 2104–2113
- Rienzi L, Vajta G, Ubaldi F. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. *Reprod Update*. 2011 Jan-Feb; 17(1):34-45.
- Ruíz de Assín R, Gonzálvo MC, Clavero A, Zamora S, Fernández A, Roldán M, et al., Reducción de la variabilidad interobservador en la evaluación embrionaria tras sesión de consenso entre expertos *Rev. ASEBIR* 2008; 13 (2): 10-13.
- Ruiz de Assensi R, Clavero A, Gonzalvo MC, Ramírez JP, Zamora S Fernández A, et al. Comparison of methods to determine the assigned value in an external quality control programme for embryo evaluation. *RBM Online* 2009; 19 (6): 824-829
- Ten J, Ardoy M, Calderón G, Cuadros J, de los Santos MJ, Herrer R et al. Clasificación embrionaria según los criterios ASEBIR: resultados de su aplicación en la práctica clínica en diferentes centros. IV Congreso ASEBIR, Bilbao 2007. *Rev ASEBIR* 2007; 12 (2): 14-16
- Torelló, MJ. Criterios-ASEBIR de valoración morfológica de ovocitos, embriones tempranos y blastocistos III Congreso ASEBIR, Zaragoza, 2005. *Rev ASEBIR* 2005; 10(2): 8
- Torelló MJ, Colomar A, Tur R, Aurell R, Veiga A, Barri PN. Criterios de valoración de calidad embrionaria y tasa de implantación en transferencias selectivas de un embrión. XXVI Congreso Nacional SEF pp193
- Van Royen E, Mangelschots K, Vercruyssen M, De Neubourg D, Valkenburg M, Ryckaert G et al., Multinucleation in cleavage stage embryos *Human Reproduction* 2003; 18 (5):1062-1069
- Vanrell I, Pons MC, Grossmann M, Solvas I, Coloma E, Julve X, Nadal J. Valoración de la aplicación del sistema de clasificación ASEBIR en Centro Médico Teknon. IV Congreso ASEBIR, Bilbao 2007. 024
- Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol*. 2010 Oct; 28(10):1115-21



¿Sabe que
están haciendo
sus embriones
mientras duerme?



EmbryoScope™ Embryo Monitoring System

Monitorización continua de los embriones en cultivo



EmbryoViewer™ Workstation

Sistema de gestión de datos en 4D



EmbryoSlide® Culture Dish

Condiciones de cultivo controladas

Sistema de Time-lapse

Observación permanente de los embriones para una mejor toma de decisiones

Cultivo sin interrupciones

Condiciones de cultivo estables en un entorno controlado

Evaluación flexible

En cualquier momento, en cualquier lugar, no se pierda nada

Información completa en 4D

Haga un mejor análisis teniendo toda la información

OLYMPUS

Your Vision, Our Future


**UNISENSE®
FERTILITECH**

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

Antonio González-Utor

El Grupo de Interés presentará la actualidad del trabajo realizado, los proyectos en marcha y las propuestas de futuro del grupo.

MEDIDAS DE SEGURIDAD EN EL MANEJO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

Montse Boada

Departamento de Obstetricia, Ginecología y Reproducción. Institut Universitari Dexeus. Barcelona.

e-mail: monboa@dexeus.com

INTRODUCCIÓN

Los laboratorios de reproducción asistida son laboratorios en los que se trabaja con un material muy preciado y con el que se debe proceder con máximo rigor y minimizando los riesgos. Normalmente, cuando se habla de seguridad en el manejo de muestras biológicas, siempre solemos pensar en los casos de muestras de riesgo biológico con las que es preciso adoptar medidas de seguridad extremas para evitar una posible contaminación cruzada. Sin embargo, la práctica clínica diaria conlleva muchísimos otros riesgos que deben evitarse y para ello, la única solución es disponer de un sistema de control de calidad implementado no solo porque la normativa actual lo exige sino para mejorar la seguridad y resultados del laboratorio. Es imprescindible disponer de todos los procedimientos de laboratorio protocolarizados de acuerdo a los estándares de calidad, realizar controles de calidad internos y externos, evaluar los resultados de acuerdo a los indicadores de calidad establecidos, registrar incidencias y planificar proyectos de mejora. Trabajar de acuerdo a los protocolos normalizados de trabajo no solo disminuye la variabilidad de resultados y eficiencia entre los distintos miembros de un mismo equipo, sino que disminuye enormemente los riesgos de error.

Los riesgos pueden ser de naturaleza muy variada y pueden afectar al propio personal o a los pacientes. En el caso de los pacientes, el grado de afectación puede ser distinto según afecte únicamente a las muestras que manipulamos (gametos, tejido gonadal

o embriones), a los propios pacientes o sus cónyuges, o a los futuros niños que nazcan fruto de la técnica de reproducción asistida efectuada. En cuanto al personal, los técnicos y embriólogos del laboratorio, los médicos del servicio, personal afín e incluso a la dirección del centro, si una demanda llegara a producirse, pueden verse afectados por una situación de riesgo importante. Es evidente que no deben ahorrarse esfuerzos en planificar correctamente el buen funcionamiento de un laboratorio de reproducción asistida, ya sea de andrología, FIV o DGP, con el fin de minimizar los posibles riesgos y encaminar el trabajo hacia la excelencia. Un buen laboratorio no es aquel que únicamente consigue mejores resultados, sino que además debe correr los mínimos riesgos posibles y registrar el menor número de incidencias.

PERSONAL DE LABORATORIO

Para un correcto funcionamiento es imprescindible disponer del personal necesario y adecuadamente formado (Asebir, 2008; Magli et al., 2008). Es importante disponer de personal suficiente, pero no excesivo, para cubrir cualquier situación respetando los periodos de descanso, comidas, etc. La gestión de guardias, bajas, congresos u otras situaciones excepcionales también debe estar cubierta sin posibilidad de imprevistos, siendo en algunos casos recomendable disponer de colaboradores externos o *free-lance* que puedan cubrir dichas situaciones sin sobrecargar al equipo habitual. La falta de personal y un exceso de trabajo suele comportar cansancio, falta de atención y, en consecuencia, mayor

riesgo de errores. El personal debe poder realizar todo el trabajo que se haya programado (asistencial, docencia e investigación) respetando siempre la premisa de que no se deben realizar dos procesos distintos simultáneamente y que se dispondrá siempre de un *controller* que puede ser otro biólogo, un técnico u otro personal del *staff* que en los procedimientos críticos verifique la identidad de las muestras. Actualmente se están desarrollando algunos sistemas alternativos para identificar las muestras y minimizar los riesgos de error que emplean, además de los códigos de barras habituales, sistemas de alarma por radiofrecuencia que avisan cuando en una misma estación de trabajo se introducen muestras de distintos pacientes (Glew et al., 2006). Asimismo, nuevos métodos, hoy por hoy aun experimentales, están estudiando la posibilidad de aplicar dispositivos microscópicos de formas distintas a la zona pelúcida de los ovocitos y embriones para marcarlos y poder distinguirlos evitando confusiones con los de otras pacientes (Novo et al., 2011). Si no se dispone de ninguno de estos sistemas alternativos de vigilancia, debería velarse siempre para que ningún embriólogo trabaje nunca solo sin un *controller*.

Es altamente recomendable realizar formación continuada para preparar al personal para las nuevas técnicas o avances que se vayan produciendo. La realización de controles de calidad internos servirá para comparar los resultados entre los distintos embriólogos del equipo, y los controles externos, para valorar y comparar los resultados propios con los de otros laboratorios.

Es imprescindible un adiestramiento básico del personal para evitar posturas ergonómicas inadecuadas cuando se trabaja al microscopio o a la lupa, que pueden llegar a ocasionar problemas graves de salud (cervicales, lumbares, etc.), hábitos de limpieza mínimos como el lavado de manos cada vez que se entra al laboratorio o la limpieza frecuente de los oculares y la norma de no manipular lentes de contacto dentro del laboratorio para evitar problemas oftalmológicos. La prohibición de guardar comida en el laboratorio, comer, beber, mascar chicle o fumar son asimismo normas básicas para evitar contaminaciones. El uso de material protector específico (guantes, máscara, botas) puede ser necesario para determinados procedimientos como por ejemplo para evitar quemaduras con el nitrógeno líquido. La utilización de cabinas de extracción de gases para la manipulación de productos tóxicos como por ejemplo el ácido Tiródes, etc., habitualmente usados en los procedimientos de DGP, es altamente recomendable.

El lema "Trabaja, pero seguro" también debe aplicarse a los laboratorios de TRA. Hay que cumplir la normativa de Riesgos laborales pero adecuándola a las peculiaridades de nuestros laboratorios y al material con que trabajamos. La seguridad para el personal se consigue si hay una buena gestión de recursos y del tiempo.

DISEÑO DEL LABORATORIO

El buen diseño del laboratorio para un trabajo ágil y efectivo es de gran importancia. Siempre que sea posible, las zonas de criobiología y DGP deberían estar ubicadas fuera del laboratorio de FIV donde se realizan los cultivos para evitar los efectos nocivos de los productos que en estas áreas se utilizan. El nitrógeno líquido es un producto potencialmente peligroso. Hierve a -196°C y produce grandes cantidades de vapores de nitrógeno. El nitrógeno reduce la concentración ambiental de oxígeno al evaporarse y al ser inodoro, incoloro e insípido, se respira como si fuese aire. Por este motivo la sala criogénica debe tener una extracción de aire y se recomienda disponer de un oxímetro (Asebir, 2008) que permita

monitorizar el nivel de oxígeno en el aire y alerte cuando se rebaje críticamente.

Asimismo, dentro del laboratorio de FIV debería reducirse al máximo la entrada de papel, cajas, etc., por lo que las zonas de almacén y archivo deberían estar fuera del laboratorio. Una buena distribución de los equipos como por ejemplo, disponer de una cabina de flujo laminar y un incubador al lado de cada equipo de micromanipulación, facilita el trabajo y evita errores. Disponer de una fuente de energía independiente que garantice la autonomía en caso de interrupción del suministro eléctrico es imprescindible para todos los equipos críticos. Las condiciones de trabajo (luz, temperatura) y ambiente en general son también factores a controlar para favorecer el trabajo eficaz y sin riesgos. Trabajar en condiciones de luz muy tenue puede favorecer la aparición de errores. La utilización de luz amarilla en lugar de luz blanca disminuye enormemente los efectos deletéreos de la luz sobre los gametos y embriones y a su vez, no afecta negativamente el confort del personal de laboratorio. Controles anuales del aire del laboratorio (análisis de partículas y volátiles), así como verificación de la presión positiva, los filtros y la renovación del aire, son necesarios.

La limpieza frecuente de los incubadores con productos no corrosivos pero con efecto fungicida y bacteriostático evitará contaminaciones en los cultivos. Productos de limpieza específicos para laboratorios diluidos en agua son los adecuados para suelos y superficies. La práctica de controles microbiológicos periódicos tanto de las superficies del laboratorio como del interior de los incubadores es necesaria para controlar la ausencia de gérmenes.

MUESTRAS DE RIESGO BIOLÓGICO

La bioseguridad entendida como la práctica especialmente diseñada para el adecuado manejo y manipulación de material u organismos de riesgo biológico se considera de crucial importancia. Solamente los laboratorios que cuenten con áreas específicas deberían trabajar con agentes infecciosos. El personal debe estar testado para VIH, VHC, VHB, presentar serologías negativas y debe

estar vacunado contra la hepatitis B. Debe estar informado de los riesgos que supone manejar material biológico infectado y ser suficientemente competente y tener el conocimiento y experiencia adecuados para desarrollar las tareas que le son asignadas sin cometer errores que supongan un incremento del riesgo de contagio para sí mismo o para los pacientes. Es importante disponer en el laboratorio de un manual de bioseguridad para saber como proceder correctamente.

Para manipular muestras infecciosas o potencialmente contagiosas se recomienda el uso de cabinas de flujo laminar de clase II, que protegen tanto a la muestra como al operario. Estas cabinas poseen un panel frontal de protección y mantienen un flujo laminar vertical estable en el interior con un sistema de filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air). Asimismo, es aconsejable disponer de equipamiento específico para la manipulación de muestras infectadas que no debe usarse para el resto de la rutina del laboratorio. Son medidas de protección el uso de gafas, mascarillas, doble guantes, pipeteadores automáticos y objetos no punzantes, así como la señalización diferencial de todos los contenedores de almacenamiento de gametos y embriones y demás equipos en los que se maneje o conserve material de riesgo. Es imprescindible disponer de contenedores específicos para residuos infecciosos, realizar una descontaminación rutinaria de los desechos y limpiar las superficies y equipos tras su utilización con desinfectantes oxidativos que no contengan alcohol (Asebir, 2008).

En un laboratorio de TRA, el riesgo para el personal de laboratorio viene provocado por la existencia o realización de una herida percutánea, ingestión o exposición de mucosas a una muestra infectada. Cuando se desconoce si una muestra puede estar infectada o no, es crucial cumplir la norma básica de considerar cualquier muestra biológica como potencialmente contaminante y por tanto tratarla como una muestra potencialmente de riesgo biológico. Debe ser preceptivo el uso de guantes para la manipulación de cualquier muestra y no quitárselos hasta finalizar

el proceso. Es altamente recomendable disponer del resultado de los análisis serológicos de los pacientes antes de empezar a procesar cualquier muestra. Hasta el momento, no se ha reportado ningún caso de contaminación del personal de los laboratorios de TRA por manipulación de muestras infectadas, y cuando los pacientes o donantes han estado testados y el resultado es negativo, el riesgo para el personal puede considerarse mínimo (Wingfield y Cottell, 2010). Distinto es cuando se tiene conocimiento de que la muestra es positiva para virus de transmisión sanguínea (BBVs) como son el virus de la hepatitis B (VHB), virus de hepatitis C (VHC) y virus de inmunodeficiencia humana (VIH). En este caso deben extremarse las precauciones de procesamiento y manipulación para evitar el riesgo de contagio para el personal y/o otras muestras procesadas o almacenadas en el laboratorio. Según la bibliografía, la mayoría de las contaminaciones del personal suelen producirse por vía percutánea y solo un 20% son causadas por contacto a través de las mucosas cutáneas o conjuntivales (Elder et al., 2005). Los casos descritos de transmisión del VHC de un paciente a otro se han atribuido a la falta de seguimiento de las estrictas medidas de precaución y/o limpieza y descontaminación del material empleado (Lesourd et al., 2000).

Hepatitis B: El virus de la Hepatitis B es muy estable y puede persistir en el ambiente durante largos periodos. El riesgo de contaminación por contacto con material contaminado se estima del 30%. Se puede inactivar con alcohol, soluciones hipocloradas y compuestos de amonio. Cuando un paciente (varón o mujer) presenta el antígeno HBsAg positivo debe recomendarse la vacunación del cónyuge. En el DNA de los espermatozoides de varones positivos se han encontrado secuencias virales integradas (Huang et al., 2002) lo que demuestra que los espermatozoides podrían actuar como vector para la transmisión vertical por vía germinal a la progenie. Teniendo en cuenta que los procedimientos de lavado seminal son altamente efectivos, cuando un varón es portador crónico del VHB no debe contraindicarse la realización de una FIV/ICSI, sin

embargo, algunos autores se muestran más reticentes cuando es la mujer quien es la portadora crónica del virus ya que el VHB puede atravesar la zona pelúcida de los ovocitos, y al practicarse la microinyección espermática podría favorecerse su introducción, pudiendo llegar a integrarse en el DNA del ovocito y al fecundarse, pasarlo al embrión (Lutgens et al., 2009).

Hepatitis C: Este virus es más lábil y solo aguanta a temperatura ambiente periodos cortos de tiempo. El riesgo de infección es aproximadamente del 1,8% y en un laboratorio suele ser por vía parenteral, generalmente por herida causada por material punzante contaminado. Se puede inactivar con alcohol, soluciones hipocloradas y compuestos de amonio. No hay vacuna para este virus y el riesgo de contaminación por vía sexual es muy bajo. Como el riesgo de transmisión vertical y horizontal es limitado, no está contraindicada la práctica de una TRA tanto si es el varón como la mujer quien presenta el VHC+, aunque se recomienda un seguimiento estricto y empezar el tratamiento de TRA cuando la carga viral sea baja y al cabo de unos meses de haber dejado el tratamiento. El genoma del VHC no es de DNA sino de RNA, sin actividad transcriptasa inversa, por lo que aunque se puede encontrar carga viral en el plasma seminal en concentraciones muy variables según las muestras (Abou-Setta, 2004), es imposible que se integre en el genoma de los espermatozoides o embriones (Steyaert et al., 2000). Aunque algunos autores recomiendan que es necesario testar cada muestra de semen antes de su utilización en TRA (Elder et al., 2005), no existe consenso ya que si se prepara la muestra adecuadamente, las probabilidades de que se encuentren virus en la solución final son prácticamente nulas. Existen amplias series publicadas que demuestran que no se ha producido seroconversión tras TRA en pacientes VHC positivos (Semprini et al., 2001).

VIH: El virus del VIH afecta mayoritariamente a individuos en edad reproductiva y el riesgo de contagio al otro miembro de la pareja o a la descendencia es muy elevado. Este virus es lábil en el ambiente y el riesgo

de infección tras herida punzante se estima en 3/1000 y de 1/1000 si es por exposición directa sobre mucosas. Antes de empezar una TRA en parejas serodiscordantes en las que el varón es VIH+, es imprescindible comprobar que las últimas determinaciones de la carga viral en plasma sean negativas y el nivel de CD4 sea correcto. La muestra de semen también deberá testarse y únicamente utilizarse si es negativa. La preparación de la muestra seminal debe realizarse mediante gradientes de densidad, repetidos lavados y *swim up*, y aplicando todas las medidas de seguridad para muestras de alto riesgo biológico (Semprini, 1992). En ningún caso se aceptarán muestras en las que se observe la presencia de leucocitos en el eyaculado ya que se conoce que los glóbulos blancos son las células huésped del VIH en el plasma seminal de los individuos infectados (Quayle et al., 1997). En el caso de que sea la mujer VIH+, deben extremarse las precauciones durante la punción folicular. Se recomienda la descontaminación de todas las superficies con soluciones hipocloradas al 10% y óxido de etileno para la esterilización del instrumental, aunque siempre es preferible la utilización de material de un solo uso. En estos casos es muy importante explicar a la paciente, previamente al inicio del ciclo, los riesgos de transmisión perinatal, la necesidad de realizar el parto por cesárea y desaconsejar la lactancia materna.

NORMATIVA ACTUAL

En el año 2004, el Parlamento Europeo publicó una directiva sobre los estándares de calidad y seguridad para la donación, obtención, evaluación, procesamiento, congelación, almacenaje y distribución de tejidos y células de origen humano, para todos los estados miembros de la Unión Europea y del Área Económica Europea (2004/23/EC). El objetivo de esta directiva es establecer unos criterios uniformes para todos los países miembros para la importación/exportación de tejidos humanos, la abierta disponibilidad de los tejidos donados, pero también asegurar la buena praxis, trazabilidad de todas las muestras y evitar errores procedentes de múltiples y variados

sistemas de procesamiento, codificación y clasificación. En definitiva, promover la implantación de sistemas de calidad así como sistemas de seguridad para evitar riesgos. Aunque inicialmente se plantearon algunas dudas sobre su aplicación en el ámbito de la reproducción asistida, queda claro que a pesar de las características particulares de nuestro campo, esta directiva aplica también para las células reproductivas (semén, ovocitos, tejido testicular, tejido ovárico y embriones) y en consecuencia, es de aplicación en todos los centros que dispongan de laboratorios de reproducción asistida y/o Criobancos que preparen muestras para la práctica de inseminación artificial y/o Fecundación In Vitro y/o almacenen muestras (gametos, tejidos gonadales o embriones).

En España la transposición de la directiva a nuestro marco jurídico se realizó mediante la promulgación del Real Decreto 1301/2006 y es la Organización Nacional de Transplantes la autoridad competente en España de la implementación de la directiva. Para los aspectos relacionados con las TRA, la Ley 14/2006 sobre técnicas de reproducción humana asistida sigue estando vigente pero se complementa con la nueva norma. Uno de los aspectos importantes del RD 1301/2006 es que obliga a disponer de un sistema de control de calidad a los laboratorios de Reproducción Asistida y bancos de gametos, tejidos gonadales y embriones. Entre muchos de los temas que regula destacan la biovigilancia, trazabilidad y bioseguridad.

Biovigilancia: El RD 1301/2006 establece en su artículo 34 que se creará un sistema de biovigilancia que permitirá notificar, registrar y transmitir información sobre los efectos y reacciones adversas graves. Se entiende por "Efecto adverso grave" aquel hecho desfavorable vinculado a la obtención, evaluación, procesamiento, almacenamiento y distribución de células y tejidos que pueda conducir a la transmisión de una enfermedad, a la muerte del paciente, o a estados que hagan peligrar su vida, minusvalías, incapacidades, hospitalización o su prolongación y por "Reacción adversa grave" a la

respuesta inesperada del donante o del receptor, incluida una enfermedad transmisible, asociada a la obtención o aplicación, que resulte mortal, potencialmente mortal, discapacitante, que produzca invalidez o incapacidad, hospitalización, enfermedad o su prolongación. Cualquier tipo de error en la identificación, pérdida o *mix-up* de gametos o embriones debe considerarse un efecto adverso grave, y si ello conduce al nacimiento de un niño, entonces debería contabilizarse también como una reacción adversa grave. Por desgracia, aunque la normativa europea estableció la puesta en marcha en todos los estados miembros de un sistema de biovigilancia para la comunicación y control de los efectos y reacciones adversas, este sistema no se ha implementado aun en nuestro país para los centros de reproducción asistida, a diferencia de otros países como por ejemplo Inglaterra, en el que todos los incidentes deben comunicarse a la Human Fertilisation and Embryology Authority (HFEA) y pueden ser supervisados por el *National Health Service (NHS)* (Toft, 2004). La falta de un sistema estatal de biovigilancia, no excluye sin embargo a los centros de la obligación de instaurar un sistema propio de control y análisis de incidencias.

Trazabilidad: Otro aspecto importante del RD 1301/2006 es que exige poder garantizar la trazabilidad de cualquier muestra o proceso. Esto significa que cualquier gameto, embrión o tejido gonadal debería poderse localizar e identificar en cualquier momento de su procesamiento, almacenaje o envío. Asimismo, se especifica que es imprescindible que se registre claramente la identidad de la persona que manipula la muestra en todo momento, la fecha y hora de cada proceso desde el principio hasta el final, así como de todo el material que ha intervenido. El registro de los datos debe realizarse preferiblemente mediante un sistema informatizado y efectuándose copias de seguridad de forma periódica para garantizar que puedan custodiarse por un periodo de tiempo largo, de al menos 30 años. La incorporación de un nuevo sistema de codificación que obligue a todos los centros a trabajar con un código único e inequívoco para la identificación de las muestras es otro de los aspectos

positivos de la directiva ya que cuando se establezca, facilitará la comunicación y registro de los datos inter-centros, siendo de gran importancia principalmente en los casos de distribución o importación/exportación de gametos, embriones o tejido gonadal.

Bioseguridad: Las medidas de bioseguridad establecidas por la directiva europea y en consecuencia el RD 1301/2006, constituyen uno de los aspectos más conflictivos de la norma en el caso de la reproducción asistida. En opinión de los expertos, estas medidas exceden a las necesidades reales, pudiendo incluso comprometer el éxito de las TRA (Mortimer, 2005) (Bhargava, 2005).

- **Calidad del aire:** se establece que al menos debe ser equivalente al grado D de la Guía Europea de Normas de correcta Fabricación en lo que al contaje de partículas y colonias microbiológicas se refiere y siempre que las células se vayan a procesar en exposición abierta y sin un proceso de inactivación biológica, se exigirá una calidad del aire equivalente al grado A. Este aspecto de la norma ha propiciado numerosas críticas por considerarse inadecuada a los laboratorios de TRA y la ESHRE se ha posicionado en contra (ESHRE, 2007).
- **Serologías:** A pesar de que nunca se ha reportado una contaminación cruzada en TRA, la directiva establece el análisis sistemático para el cribado de estas enfermedades antes de empezar cada ciclo de TRA. La ESHRE manifiesta el gran impacto económico que representa la adopción de estas medidas y sugiere un sistema en el que los análisis para donaciones entre miembros de una misma pareja puedan realizarse durante los 30 días previos al inicio del tratamiento y cuando el test resulte negativo, éste sea válido como mínimo durante 24 meses. En las donaciones fuera de la pareja, la ESHRE reconoce que la situación es distinta y manifiesta que actualmente no hay consenso entre los distintos países de la UE (ESHRE, 2009). Wingfield y Cottell (2010) consideran que no hay evidencia

científica que sostenga que es necesario repetir las analíticas en cada ciclo y considerarían más adecuado intentar reducir los riesgos de contaminación cruzada combinando la regulación del *screening* previo con unas medidas adecuadas de procesamiento y mejora de los sistemas de almacenamiento.

- Criopreservación: El RD 1301/2006 establece que deberá disponerse de una infraestructura de almacenamiento que permita impedir contaminaciones cruzadas y mezclas simples. Es importante tener en cuenta que en el ámbito de la reproducción asistida, aunque no se ha detectado ningún caso de contaminación cruzada en la criopreservación de gametos y embriones, la probabilidad de que se produzca se considera razonablemente baja aunque no nula. La alarma saltó en 1995 cuando seis pacientes sometidos a tratamientos citotóxicos por problemas hemáticos desarrollaron un brote agudo de hepatitis B después de someterse al autotrasplante del material criopreservado (médula ósea y/o sangre periférica) que había sido almacenado en el mismo tanque criogénico que el de otros pacientes infectados con hepatitis B. En este caso, el contagio se produjo como consecuencia de un error en el empaquetamiento y almacenaje de las muestras, ya que se observó que las bolsas que contenían el material infeccioso se deterioraron con el tiempo provocando la contaminación del nitrógeno del tanque y de algunas de las otras muestras que allí se almacenaban (Tedder et al., 1995). Estudios posteriores demuestran que el factor decisivo para evitar el contagio es el correcto envasado de las muestras. Se comprobó que muestras criopreservadas en pajuelas selladas herméticamente no se contaminaban a pesar de estar almacenadas en nitrógeno líquido contaminado (Bielanski et al., 2000). Asimismo se demostró que tampoco se contaminaba el nitrógeno ni otras muestras

criopreservadas en el mismo tanque cuando muestras infectadas con virus se almacenaban en pajuelas correctamente selladas (Bielanski et al., 2003). En el caso de la reproducción asistida, la utilización de pajuelas o soportes cerrados para la criopreservación de gametos, embriones y tejido gonadal evita este riesgo aunque puede afectar a la tasa de supervivencia y viabilidad de las muestras (Pomeroy et al., 2010). Actualmente se están valorando otras medidas para minimizar los riesgos teóricos de una posible contaminación cruzada y seguir utilizando soportes abiertos, sobre todo para la vitrificación de ovocitos. Algunas de las alternativas propuestas son el uso de contenedores de nitrógeno en fase vapor (Bielanski, 2005) o la esterilización del nitrógeno líquido por ultrafiltración o radiación ultravioleta (Parmegiani et al., 2010). Los tanques de vapores de nitrógeno poseen menor capacidad para enfriar y se calientan con mayor rapidez produciendo en consecuencia grandes fluctuaciones de temperatura. Hoy por hoy no existe la solución perfecta para congeniar la norma con las necesidades técnicas sin comprometer la eficacia de la técnica, por lo que se deberá seguir buscando nuevas alternativas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abou-Setta AM. Transmisión risk of hepatitis C virus via semen during assisted reproduction: how real is it? *Hum Reprod* 2004; 12:2711-2717.

ASEBIR. Cuadernos de Embriología Clínica. Recomendaciones sobre Recursos Humanos y Físicos para el Laboratorio de Reproducción Asistida Humana. Ed. ASEBIR 2008.

Bhargava PM. On the critical assessment of the impact of the recent European Union Tissues and Cells Directive. *RBM Online* 2005; 11:161.

Bielanski A, Nadin-Daris S, Sapp T, Lutze-Wallace C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. *Cryobiology* 2000; 40:110-116.

Bielanski A, Bergeron H, Lau PC, Devenish J. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology* 2003; 46:146-152.

Bielanski, A. Non-transmission of bacterial and viral microbes to embryos and semen stored in the vapour phase of liquid nitrogen in dry shippers. *Cryobiology* 2005;50: 206-210.

Elder K, Baker D, Ribes J. *Infections, Infertility and Assisted Reproduction*. Cambridge University Press; 2005.

ESHRE. (2007) ESHRE position paper on the EU Tissues and Cells Directive EC/2004/23. <http://www.eshre.eu/ESHRE/English/Guidelines-Legal/ESHRE-Position-Papers>.

ESHRE. (2009) Statement of the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) on the European Commission proposal of viral screening in assisted reproduction treatments. <http://www.eshre.eu/ESHRE/English/Guidelines-Legal/ESHRE-Position-Papers>

Glew AM, Hoha K, Graves J, Lawrence H, Read S, Ah-Moye M. Radio frequency identity tags "RFID" for electronic witnessing of IVF laboratory procedures. *Fertil Steril* 2006; 86. suppl 1. p.S170.

Huang JM, Qiu HY, Fang XW, Zhuang TG, Qiu JW. Studies on the integration of hepatitis B virus DNA sequence in human sperm chromosomes. *Asian J Androl* 2002;4:209-212.

Lesourd F, Izoped J, Mervan C Payen JL, Sandres K, Monrozies X, Parinaud J. Transmission of hepatitis C virus during the ancillary procedures for assisted conception. *Hum Reprod* 2000;15:1083-1085.

Lutgens S, Nelissen E, Van Loo I, Koek G, Derhaag J, Dunselman G. To do or not to do: IVF and ICSI in chronic hepatitis B virus carriers. *Hum Reprod* 2009;24:2676-2678.

Magli C, Van den Abbeel E, Lundin K, Royere D, Van der Elst J, Gianaroli L. ESHRE Committee of the Special Interest Group on Embryology. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories. *Hum Reprod* 2008; 23: 1253-1262.

Mortimer D. A critical assessment of the impact of the European Union Tissues and Cells Directive (2004) on laboratory

practices in assisted conception. *RBM Online* 2005;11:162-176.

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

Parmegiani L, Accorsi A, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Filicori M. Sterilization of liquid nitrogen with ultraviolet irradiation for safe vitrification of human oocytes or embryos. *Fertil Steril* 2010;94:1525-1528.

Pomeroy KO, Harris S, Canaghan J, Papadakis M, Centola G, Basuray R, Battaglia D. Storage of cryopreserved reproductive tissues: evidence that cross-contamination of infectious agents is a negligible risk. *Fertil Steril* 2010;94:1181-1188.

Quayle AJ, Xu C, Mayer KH, Anderson DJ. T lymphocytes and macrophages, but not motile spermatozoa, are a significant source of human immunodeficiency virus in semen. *J Infect Dis* 1997;176:960-968.

Semprini AE, Levi-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; 340:1317-9.

Semprini AE, Vucetich A, Persico T. Hepatitis C detection. *Lancet* 2001;357:557.

Steyaert SR, Leroux-Roels GG, Dhont M. Infections in IVF: review and guidelines. *Hum Reprod* 2000;6:432-441.

Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH, Hawkins AF, Fielding A, Briggs EM, Irwin D, Blair D, Gorman AM, Patterson KG, Linch DC, Heptonstall J, Brink NS. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet* 1995; 346: 137-140.

Toft B. Independent review of the circumstances surrounding four adverse events that occurred in the Reproductive Medicine Units at the Leeds Teaching Hospitals NHS Trust, West Yorkshire. Department of Health; 2004.

Wingfield M and Cottell E. Viral screening of couples undergoing partner donation in assisted reproduction with regard to EU Directives 2004/23/EC, 2006/17/EC and 2006/86/EC: what is the evidence for repeated screening? *Hum Reprod* 2010; 25:3058-3065

REFERENCIAS LEGALES:

Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 on setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells. Official Journal of the European Union L 102, 07/04/2004 P. 0048 – 0058.

Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida. BOE núm 126, 19947-19956.

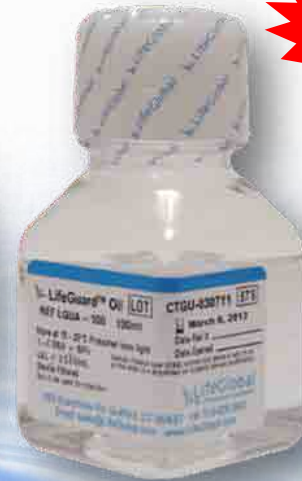
Ley 31/1995 de 8 de noviembre, de Prevención de Riesgos Laborales. BOE núm 269. 32590-32611.

Real Decreto 1301/2006, de 10 de noviembre, 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 en humanos. BOE núm 270, 39475-39502.

Nuevo **Global Total™**, suplementado con Albúmina enriquecida con α y β Globulinas



Nuevo **LifeGuard™** Aceite de alta calidad con alta viscosidad para proteger el embrión humano



Sistema S3 para la Vitrificación de Blastocistos Humanos:

- No contiene DMSO
- Glicerol y Etileno Glicol, como Crioprotectores. Global w/ Hepes, como medio base
- Sistema de sellado cerrado, con pajuelas convencionales



Pipetas ICSI



Agujas Punción OPS



Catéter de Transferencia Full Echo



Catéter de Transferencia Pearl Tip



Placas Calefactadas



Selladora por ultrasonidos



Baño en seco



Estación de trabajo

QUALITY CONTROL PROCESSES WITHIN THE EMBRYOLOGY LABORATORY (CONTROL DE CALIDAD EN LOS PROCESOS DEL LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA)

Klaus E. Wiemer PhD

INTRODUCTION

Thorough understanding of every process that occurs within the IVF laboratory is essential for efficient development of human embryos as well as maintaining high implantation rates. Understanding how variables and outside influences can impact outcomes is of paramount importance as well. The basis of most quality control (QC)/ quality assurance (QA) programs is to thoroughly understand all the steps involved within a process as well as recognize how variables can interact within the processes that can either influence embryonic developmental rates or pregnancy rates.

The development of the human embryo within an *in vitro* environment presents many challenges to the clinical embryologist. We must recognize that we are trying to allow a highly regulated sequence of events to occur without any external influences that a lab, its materials and environment might have on the process required for an oocyte to become a competent embryo. The key to a quality management system which incorporates QC and QA is to ensure repeatability of embryo quality and outcomes within the laboratory.

In this discussion, we will review the various steps involved within the clinical IVF laboratory and what steps might help in reducing variability within the embryology laboratory.

MATERIALS AND METHODS

Before we begin our discussion of quality management, we should first clarify a few matters. We must recognize that the human embryo is a unique structure because of the dynamic changes that occur within the embryo during its course of development within the laboratory

(Leese, 1991). The changes that are noted are not only morphological but functional as well. During preimplantation development, the fertilized oocyte changes from a metabolically quiescent entity under the control of maternal transcripts into a dynamic multicellular, rapidly developing embryo under its own functioning genome with complete homeostatic mechanisms. The ability to allow this transition to occur without any induced stress can have far reaching consequences. Perturbations in the environment that can be caused by a variety of factors can result in reduced embryo viability and impaired development post transfer. It is important for clinical embryologists to recognize that these perturbations do not always affect embryo morphology but can affect far reaching consequences on a cellular level. Therefore, it is important to understand that any aberrations during the collection of oocytes and culture of embryos can significantly alter developmental potential and cellular mechanisms without altering embryo morphology thus making the assessment of culture conditions difficult.

Previously it was discussed that the embryo is a dynamic entity that changes rapidly during the typical time periods that embryos are cultured prior to replacement and/or cryopreservation. More specifically, the human embryo prior to compaction is extremely sensitive to outside variables due in principal to lack of self regulating mechanisms such as intracellular pH (Baltz et al., 1990). Therefore, even small alterations such as pH and temperature fluctuations within the culture environment at early pre-compaction developmental stages can result in far reaching developmental and functional capabilities within the embryo.

RESULTS AND DISCUSSIONS

When contemplating the type of quality management system to implement in an IVF laboratory, one of the initial decisions that should be made is if the systems will be proactive as compared to a reactive system. The type of system that is implemented is principally based upon resources available such as lab personnel as well as philosophical approach to this topic. This author believes in implementation of both types of systems.

This discussion will deal in principal with proactive measures that can reduce variability within the laboratory. Reactive methods of QC are very easy to implement. For example, the implementation of a spreadsheet whereby all manufacture lots of plasticware are logged into is an example of a reactive form of QC. It is a reactive form of QC because lab personnel will refer back to this spreadsheet if there is a suspected issue within a certain lot of plasticware. In contrast, testing of plasticware prior to implementation is a proactive form of QC.

PLASTICWARE

Prior to use, all plasticware that comes in contact with human gametes should be tested. The most practical method to test this is using a human sperm assay. Admittedly, human sperm are not as sensitive as using one or two-cell mouse embryos but the cost of mouse embryos makes this impractical for most laboratories. In addition, the volume of material that is tested makes the use of mouse embryos not practical. To perform this test, one will need a proven sperm donor that has demonstrated good sperm survival over an extended period of time. We perform direct contact testing in our laboratories. We have plasticware that we know has passed our testing which

serves as a control and then compare this to the plasticware in question by incubating media over night in an incubator with the plasticware to be tested as well as the control. A known concentration of sperm is placed into the previously incubated media from the plasticware that is in question as well as the control plasticware. The sperm parameters such as motility, rate of forward progress and percent motile are noted at the onset. The samples are incubated for a total of 48 hours in a CO₂ incubator and motility characteristics are noted at 24 hour intervals. The samples from the plasticware in question must be within 80% of the control. The entire test is invalid if the motility of the control is less than 50%. In addition to incubation at 37°C, we also incubate samples at room temperature for a total of 96 hours and compare the motility characteristics to the control over 24 hour increments. We use the same criteria as described above for the room temperature samples in determining the suitability of plasticware.

When we find manufactured lots of plasticware that pass our testing, we try to purchase as much of that lot as reasonable. For embryo culture dishes, we have recently started to use mouse embryo tested dishes in order to reduce the amount of testing performed. In addition, any plastic containers, tubes and flask that we use to make media in or store such products as human albumin are rinsed with culture media prior to use.

INCUBATORS

The incubator environment is the single most important aspect of the IVF laboratory. Incubator temperatures, carbon dioxide levels as well as oxygen levels should be checked several times a week. Determination of pH should be performed several times a week as well as when a new lot of media is received. Several times a year, the temperature within the culture microdrops should be confirmed using a thermocouple. We try to maintain a pH of 7.23 to 7.30 in our culture media as well as a temperature of 37.3° C within our incubators. This allows for a temperature of 36.9 to 37.3° C within our microdrops.

Incubators should be cleaned on a regular basis and the water pans should be checked on a daily basis. The water pans can potentially be a major source of contamination and a fully humidified chamber is essential for proper CO₂ measurement by the sensors within the incubator.

An often over looked aspect of maintaining sound culture conditions is to establish a policy to reduce incubator door openings. The designation of working incubators can often reduce the number of openings for incubators designated for embryo culture. In our laboratory, we make every effort to culture no more than 4 patients per incubator. This reduces the number of incubator openings to a point we are not impacting development. Avery et al., (2000) noted that multiple incubator door openings had a negative impact on the number of cells in developing bovine blastocysts.

All of lots of gases used for the incubators are recorded and carbon inline filters are used for all gases

HEATED MICROSCOPE STAGES

All heated stages on microscopes should be tested for temperature consistency. A word of caution about heated stages should be noted. Most stages do not heat in a constant fashion but rather in a pulsating manner. This means that the temperature can vary significantly on the stage itself. This is unavoidable in most instances so this must be kept in mind when establishing a QC protocol for calibrating stage temperatures. In our laboratory, we first determine where the "hot spots" and "cold spots" are on the stage using a fine wire thermocouple and diagram this. We then set up a variety of culture dishes as well as micromanipulation dishes and confirm the temperatures within their respective drops. The temperature of the stage is then adjusted accordingly. Finally, we check the temperature within these various drops in the aforementioned dishes during different time intervals to note which drops are heating up or cooling down. We have found that by going through these steps, we have determined how long we can leave culture dishes on the stage as

well as how many oocytes we can inject when performing ICSI. For example, we can safely keep a Nunc® 35 mm dish sitting on our stage for 5-7 minutes without affecting the temperature within the drops.

BLOCK HEATERS

Block heaters are notorious for having wide temperature fluctuations. For this reason, we keep an appropriate sized water filled tube with a thermometer in all our block heaters. These temperatures are monitored on a daily basis. Because these block heaters tend to be warmer on the bottom, we make every attempt possible to not allow more than 3-4 tubes containing follicular aspirates within these heaters. We are very proactive to reduce any possible exposure of the oocytes to temperature fluctuations.

WORK STATIONS

Most embryologists work in modified heated laminar flow hoods or in converted infant isolates. Regardless of work station used, the temperatures within these devices must be established. In our IVF laboratory, we use modified heated laminar flow hoods. We first diagram the heated surfaces and establish the temperature characteristics of the hood. This allows us to determine areas that are hot or cold as compared to the set temperature. Following this step, we check the temperature of our oocyte holding dish and the micro droplets of the embryo culture dishes. We are now in a position to make any modifications to the surface temperature. We believe that the temperature of the microdrops is better reflection of culture conditions than the temperature of the actual heated surface itself. For example, the surfaces of our hoods are often set at 41.3°C to ensure microdrop temperatures of 36.9 to 37.3°C.

We pay special importance to the dish we use to hold oocytes in during the retrieval process and check the temperature following different time intervals that the dish is sitting on the heated surface. By determining the temperature characteristics of these dishes, we can establish time

limits that dishes can sit outside the incubator. In all instances, we mimic the actual conditions that the dishes will be exposed to. For example, the embryo culture dishes are checked at different time increments when placed under the humidified gas bubbling jars. In contrast, the uncovered oocyte holding dishes are kept in the area of the heated surface where this dish would normally sit during the actual retrieval process.

A WORD ON PH

The discussions thus far have emphasized the importance of understanding how the temperatures are in our various dishes and how we modify our techniques to reduce the potential of exposure to temperature fluctuations. This same philosophical approach is used with pH testing. For example, we have noted that embryo culture dishes can sit on our heated surfaces for 5-7 minutes without the temperature changing. We also established that pH changes do not start to occur until dishes have been sitting out for more than 7-8 minutes. These data points allowed us to determine that we have about 5 minutes to safely evaluate embryos without exposing them to temperature and pH fluctuations. It is very important that each IVF laboratory mimic their processes and determine if they are introducing any fluctuations that impact development.

IMPACT OF EMBRYOLOGIST ON OUTCOMES

Part of any quality management program is to track the effects of the embryologists themselves on embryo development and outcomes. This is a form of reactive QC but it nonetheless helps us reduce the impact of staffing on outcomes. The data goes into a data base and outcomes are calculated on a quarterly basis. Each center should perform these types of analysis based upon volume. The key is to perform these often enough with enough meaningful volume to ensure that the staff are not having a negative impact on outcomes. The data we record on each embryologist are the following tasks:

- Oocyte retrieval.
- ICSI or conventional insemination.
- Removal of cumulus cells at time of ICSI or following conventional insemination.
- Change over to culture droplets.
- Embryo evaluation on Days 2, 3 and 5.
- Selection of embryos for transfer.
- Embryo transfer.

EMBRYOLOGY PROCESSES

In our laboratory, following the quality management processes described above, we modified many of the embryology processes we routinely perform. For example, we found that in order to not expose our oocytes to temperature drifts, we found that placing several mls of warm oil on the HEPES buffer culture media reduced the temperature drift in our oocyte holding dish. In addition, we found that we could safely keep oocytes in an oil covered dish for up to 20 minutes. Therefore, if we anticipate that a patient is going to have a large number of oocytes, we will have a second embryologist process the oocytes from the first ovary to reduce the risk of temperature fluctuations as well as exposure to HEPES buffered media.

Similarly, we found with our heated stage that no matter how we adjusted the temperature of the stage, we still had wide ranges of temperatures in the micromanipulation dish we used for ICSI. As a consequence of this, we reduced the number of oocytes we placed into a manipulation dish to no more than 4 to 6 depending on sperm quality. The new policy reduced the temperature fluctuations the oocytes were being exposed to. In turn, this improved the quality of resulting embryos following ICSI and improved the quality of blastocysts as well.

The examples above are but many modifications that have been made in our procedures following the complete understanding of how our processes were affecting embryo quality. By understanding when pH and temperatures begin to change, one can then modify their techniques accordingly. This has resulted in much less variability within our lab.

CONCLUSION

Maintaining a consistent laboratory environment is of paramount importance if a center hopes to preserve the physiology of oocytes and developing embryos. Even small perpetuations can influence outcomes that are not always expressed as suboptimal embryo morphology. Therefore, it is important that clinical embryologists ensure that their equipment and materials do not have an adverse affect on embryo development and outcomes. In addition, it is of equal importance that there is thorough understanding of the actual embryology processes and how these can influence these aforementioned parameters. By understanding how one's technique influences the environment of the task at hand, meaningful changes can be put into place.

REFERENCES

- Avery B., Melsted, J.K., and Greve, T. (2000). A novel approach for in vitro production of bovine embryos: use of the Oxoid atmosphere generating system. *Theriogenology* 54, 1259-1268.
- Baltz, J. M., Biggers, J. D. and Lechene, C. (1990). Apparent absence of Na^+/H^+ antiport activity in the two-cell mouse embryo. *Dev. Biol.* 138, 421-429.
- Leese, H.J. (1991) Metabolism of the preimplantation mammalian embryo. *Oxford Re. Reprod. Biol.* 13, 35-72.

Tu compañero en la clínica FIV Te ofrece el laboratorio al completo



- Incubadores de CO2 y multigas
- Cabinas de flujo laminar
- Sistemas de micromanipulación
- Microscopios y esteromicroscopios
- Sistemas de control de laboratorio
- Y mucho más...



IVFtech
SANYO

KITAZATO
RI




Rocketmedical
nunc[™]



BioCare
E u r o p e

Somebody is waiting for
good news

BioCare Europe

ITALIA • ESPAÑA • FRANCE • GREECE • SWITZERLAND • PORTUGAL

Viale Regina Margherita, 262 - 00198 Roma (Italia) - Tel. 900 99 39 36- Fax +39 06 44240358

www.biocareeurope.com

ESTADO ACTUAL DEL GRUPO DE INTERÉS DE GENÉTICA Y REPRODUCCIÓN

Esther Velilla

El Grupo de Interés presentará la actualidad del trabajo realizado, los proyectos en marcha y las propuestas de futuro del grupo.

APLICACIÓN DEL ARRAY-CGH EN EL SCREENING DE ANEUPLOIDÍAS

Mireia Sandalinas
Reprogenetics. Barcelona.
e-mail: msandalinas@reprogenetics.es

INTRODUCCIÓN

Desde los años noventa, el estudio cromosómico de embriones sobrantes de FIV, mediante la técnica de FISH (Hibridación *in situ* de fluorescencia) nos ha permitido observar que un porcentaje muy elevado de los embriones de un programa de FIV son cromosómicamente anormales, y que hay determinados grupos de pacientes con un mayor riesgo de generar embriones anormales. Y lo que es más importante, los estudios que intentaron relacionar morfología y desarrollo con anomalía cromosómica concluyeron que no es posible identificar los embriones cromosómicamente anormales mediante los criterios de selección rutinariamente aplicados en el laboratorio por los embriólogos.

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, sobre todo, las de niño en casa, mejoren, y la de abortos, disminuya.

Así pues, el diagnóstico genético preimplantacional de aneuploidías surgió para intentar mejorar las posibilidades de conseguir un embarazo sano en aquellas parejas que se someten al proceso de Fecundación *in Vitro* (FIV) y cuya esterilidad o infertilidad puede ser en parte atribuible a causas cromosómicas. Las parejas con más riesgo de generar embriones anormales son las que incluyen pacientes con edad materna avanzada, historial previo de abortos, de fallos de implantación,

así como en ciertos casos de factor masculino.

El diagnóstico genético Preimplantacional de aneuploidías (DGP-AS) se llevó a cabo por primera vez en el año 1995 por los grupos de Munné (Munné et al., 1995) y Verlinsky (Verlinsky et al., 1995). Desde entonces el DGP-AS se ha venido aplicando en diferentes estadios de desarrollo embrionario, desde el corpúsculo polar en ovocitos hasta en blastocisto con biopsia de trofoblasto, siendo el estadio de mayor aplicación el de día 3, correspondiente a un embrión con 6-8 células. En sus inicios sólo se podían detectar 3 o 5 cromosomas. Con el tiempo se mejoraron los protocolos de FISH, y hasta el año 2010 el DGP-AS se ha venido aplicando en día 3 y con el diagnóstico de entre 9 y 12 cromosomas.

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), pero esta metodología presenta 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 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. En función de la morfología del núcleo, de su tamaño y/o de la presencia de citoplasma, la FISH puede verse comprometida. Por ello, el número de hibridaciones al que se puede someter a un núcleo es limitado y varía de núcleo a núcleo.

La evaluación simultánea de todos los cromosomas fue posible con la aparición de las técnicas de SKY (*Spectral Karyotyping*) (Schröck et al., 1996) y la CGH (*Comparative Genome Hybridization*) (Kallioniemi et al., 1992). Si bien con la técnica de SKY era posible la detección de todos los cromosomas, para ello el análisis se debía realizar sobre metafases y requería la fijación de la muestra, por lo que su aplicación clínica se limitó a la investigación de aneuploidía en metafases de ovocitos y corpúsculos polares. La aparición en 1992 de la hibridación genómica comparada (CGH), (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 permitió solventar los dos principales problemas de la FISH. Por una parte, no se precisaba de la fijación celular, las células se manipulaban introduciéndolas en un tubo de PCR; por otro, se analizan todos los cromosomas.

Sin embargo, las dificultades técnicas asociadas al elevado tiempo de

hibridación y de diagnóstico para aplicarla clínicamente en ciclos en fresco limitó su uso a la investigación o en clínica al corpúsculo polar. El grupo de Wilton (Wilton et al., 2003) aplicó la técnica en embriones en día 3, pero se requería la congelación de los embriones biopsiados con resultados subóptimos. 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 D+3, aunque esta aproximación no permite determinar las anomalías acaecidas en meiosis II, las de origen paterno ni las postzigóticas. Recientemente, se ha presentado una modificación de la metodología que permitiría una reducción en el tiempo necesario para obtener resultado (Rius et al., 2010), lo cual permite la transferencia dentro del mismo ciclo. Aún así, la principal desventaja de la CGH es que se trata de una técnica extremadamente compleja, en la que a pesar de tener un tiempo más reducido de hibridación, el análisis de resultados es extraordinariamente lento, lo que la convierte en una metodología de difícil uso rutinario en la práctica clínica.

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.

La puesta a punto de la vitrificación en embriones humanos permitió aplicar la técnica de CGH no sólo en embriones en día 3, sino también en estadio de

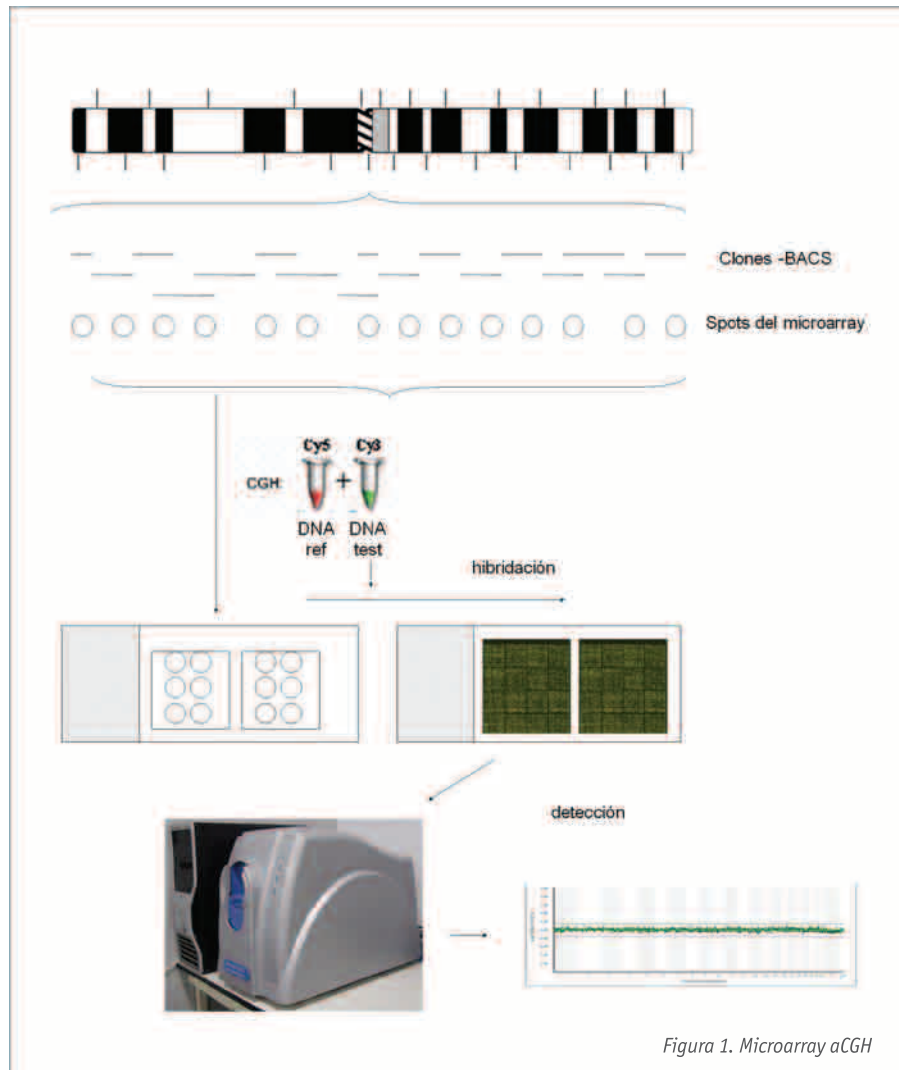


Figura 1. Microarray aCGH

blastocisto. 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 evolutivo del 68,9% (Schoolcraft et al., 2010).

MICROARRAYS

El análisis de todos los cromosomas mediante una técnica efectiva, que se pueda aplicar de forma rutinaria, que presente el mínimo error y que sea reproducible, ha sido la piedra filosofal del DGP de aneuploidías de la última década. La validez del DGP-AS para mejorar los resultados de FIV se ha visto en entredicho sobre todo debido a la dificultad de replicar la técnica de biopsia y fijación, la FISH y en

consecuencia la interpretación de los resultados. Una aplicación subóptima del DGP-AS no sólo no consigue mejorar los resultados, sino que los empeora. (Cohen et al., 2007; Munné et al., 2007).

Así pues, después de veinte años en la historia del DGP de aneuploidías, sabemos que necesitamos una técnica que analice todos los cromosomas, independientemente del estado nuclear, que sea aplicable en todos los estadios celulares, que dependa poco o nada de la habilidad del manipulador (aspecto que sigue siendo vital y de momento inevitable en la biopsia), que nos permita dar resultado en un plazo corto de tiempo, que se adapte al ciclo en fresco y que sea incorporable de forma relativamente fácil a la rutina en los laboratorios de embriología y de diagnóstico genético.

Tras muchos años de investigación, las últimas publicaciones (Hellani et al.,

Tabla 1. Resultados

		Edad Mat.	ciclos	seguim.	transf	no T	emb	EMB/ciclo	EMB/Tra	media embr.Tra	tasa implant.	EMB.en curso /CICLO	EMB.en curso /TRANSFER
G1	d3/d5	37	454	252	173	31%	94	37,3%	54%	1,63	40%	33,7%	49%
G2	d5/CP	36.5	75	40	24	40%	15	37,5%	63%	1,63	51%	37,5%	63%
	TOTAL		529	292	197	32,50%	109	37,30%	55,30%	1,63	41,70%		

d3/d5- biopsia día3, transferencia embrionaria en día 5
d5/CP- biopsia de blastocisto, día 5, transferencia en ciclo posterior

2008; Gutierrez-Mateo, 2010; Treff et al., 2010; Harper et al., 2010) apuntan a que parece ser que se ha conseguido encontrar una técnica que cumple con todos estos requisitos: la técnica de *microarrays*. No es una técnica nueva, ha sido ampliamente utilizada en el campo del estudio del cáncer, pero recientemente se ha conseguido modificarla con éxito para emplearla en célula única.

¿QUÉ ES UN MICROARRAY?

Los ensayos de hibridación en *microarrays*, descritos a finales de los años ochenta, se basan en la disposición de material genético sobre un sustrato (plástico, cristal, membranas), en posiciones conocidas.

Una colección (*array*) de ADN consiste en un gran número de moléculas de ADN ordenadas en un sustrato sólido de manera que formen una matriz de secuencias en dos dimensiones. A estos fragmentos de ADN inmovilizados en el soporte, se les denomina "sondas". Los ácidos nucleicos de las muestras a analizar se marcan por diversos métodos (enzimáticos, fluorescentes) y se incuban sobre el panel de sondas, permitiendo la hibridación (reconocimiento y unión entre moléculas complementarias) de secuencias homólogas. Durante la hibridación, las muestras de material genético marcadas se unirán a sus complementarias inmovilizadas en el soporte del chip, permitiendo la identificación y cuantificación del ADN presente en la muestra. Con posterioridad, el escáner y las herramientas informáticas nos permiten interpretar y analizar los datos obtenidos.

En el campo de la aneuploidía, la idea es la detección de la variación en el

número de copias de los cromosomas, por lo que 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 "qué" se hace 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.

En esta ponencia nos centraremos en el llamado *array*-CGH, *array* basado en la técnica de CGH (*Comparative Genome hybridization*), y los resultados obtenidos en su aplicación en ciclos de FIV-DGP-AS.

Microarrays aCGH (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 1). Sobre cada uno de estos 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 resultados de varias sondas adyacentes (figura 1).

RESULTADOS

La técnica ha sido previamente validada para su uso en blastómeros (Gutierrez-Mateo et al., 2011). Hasta la fecha se han llevado a cabo en Reprogenetics más de 500 ciclos con aCGH. 454 ciclos de FIV-DGP-AS se han realizado mediante biopsia en día 3 y transferencia en día 5 (grupo 1:G1) y 75 mediante biopsia de blastocisto, vitrificación y transferencia en ciclo posterior (grupo2: G2). El total de ciclos con seguimiento es de 292 hasta la fecha. En la tabla 1 se resumen los resultados obtenidos.

Se dispone de seguimiento en 292 ciclos de los 529 realizados. En estos casos, el porcentaje de embarazo en curso fue del 49% en el grupo de biopsia en día 3, mientras que del 63% en el grupo en el que se biopsiaron blastocistos. La media de embriones transferidos fue idéntica (1,63) en ambos grupos, mientras que la tasa de implantación de los embriones transferidos fue del 51% en el G2 y del 40% en el G1. En un 31% de los casos no hubo transferencia en el G1 y en un 40% en el G2.

Si separamos por intervalos de edad materna, observamos que si bien en el grupo 1 hay un descenso en la tasa de embarazo a medida que aumenta la edad, no sucede lo mismo en el grupo 2, en el que los porcentajes de embarazo se mantienen relativamente estables a pesar del incremento en la edad materna de la paciente. (Tabla 2).

Se biopsiaron un total de 5042 embriones, con 4541 embriones biopsiados en día 3 y 501 embriones en estadio de blastocisto. La media total de embriones normales fue del 31,5%, siendo de un 30% en el grupo1 y del 48,5% en el grupo 2.

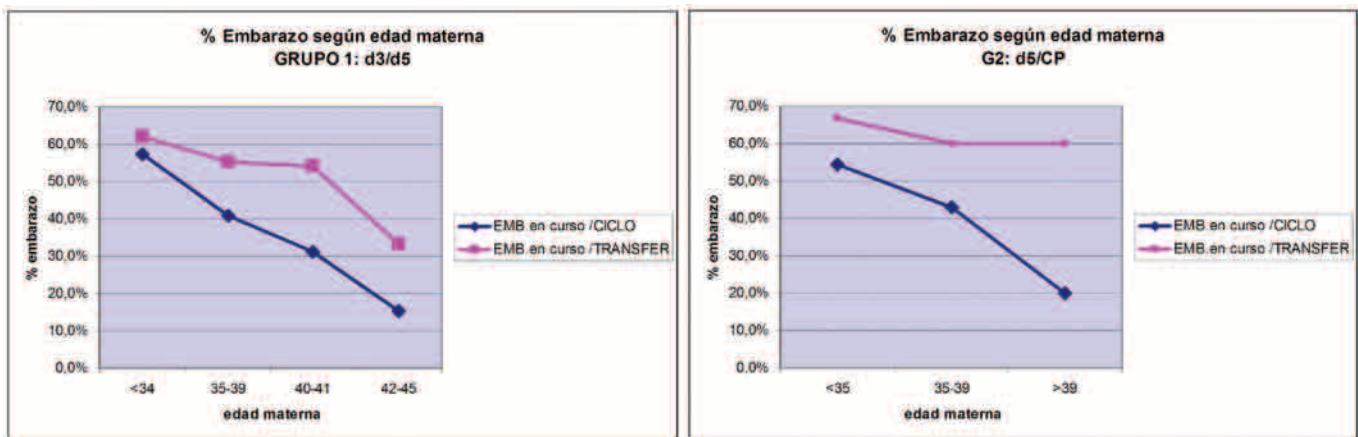


Tabla 2: Porcentaje de embarazo según edad materna en grupo 1 y grupo 2.

Para profundizar en los aspectos cromosómicos, se analizaron en detalle los resultados obtenidos de 303 embriones de 54 pacientes con una media de edad de 35,6 años del grupo 1.

La clasificación de los embriones en función del resultado cromosómico fue la siguiente:

1. embrión normal: euploide para todos los cromosomas
2. aneuploide: si presenta de 1 a 3 eventos de aneuploidía
3. anormal complejo: de 4 a 11 eventos de aneuploidía
4. caótico: con >12 eventos de aneuploidía.

La media de embriones biopsiados en este subgrupo fue de 6,02, con un 37,62% de embriones normales. Del 62,37% de los embriones anormales, el 44,5% correspondían a embriones aneuploides, el 11,5% a anormales complejos y el 6,3% resultaron ser caóticos.

En el análisis de los cromosomas afectados por aneuploidía no se tuvieron en cuenta los embriones caóticos, sólo los aneuploides y anormales complejos (tabla 3). Se contabilizaron un total de 406 eventos aneuploides con una media de 2,4 cromosomas afectados por embrión. El porcentaje de embriones con aneuploidías diferentes a las detectadas habitualmente en el test de 9 sondas fue del 24,1%, con entre 1 y 5 cromosomas afectados por embrión.

Del resultado del análisis realizado (tabla 3) se desprende que los cromosomas más implicados en aneuploidía fueron por este orden, el 22, 16, 21, 19, y 15.

Mediante el análisis de 9 aneuploidías sólo se detectarían el 52% de eventos aneuploides, pero correspondientes a un 75,9% de embriones aneuploides.

CONCLUSIONES

Históricamente, en el diagnóstico genético preimplantacional, la técnica de PCR se ha utilizado para casos de enfermedades genéticas mientras que la técnica de elección para detectar las anomalías cromosómicas ha sido la FISH. Si bien, los resultados obtenidos con la aplicación de esta técnica han sido muy positivos, el grado de experiencia es muy determinante a la hora de aplicar la técnica. Los resultados dispares obtenidos como consecuencia de la falta de experiencia en el uso de la técnica han llegado a generar un debate sobre el beneficio de la aplicación de la técnica en sí misma (Mastenbroek et al., 2007; Cohen et al., 2007; Simpson, 2008; Munné et al., 2010). La necesidad de fijar los núcleos complica el proceso, puesto que no todos los métodos de fijación utilizados son igual de óptimos, ni todos los núcleos presentan cromatina con la misma consistencia que permita hibridar repetidas veces para obtener un diagnóstico fiable.

La limitación en el uso de fluorocromos requiere hibridar múltiples veces para conseguir analizar los 24 cromosomas, por lo que la eficiencia de la técnica disminuye. La posibilidad de aplicar el llamado rescate de no resultado (NRR), hibridando con sondas diferentes a las que dan resultado dudoso o requieren confirmación, queda prácticamente eliminada. Sin posibilidad de aplicar el NRR, el error de la técnica

aumenta por encima de lo deseado y se pierden embriones que deberían poder transferirse, disminuyendo la posibilidad de selección y en consecuencia de embarazo. Por otro lado, los trabajos de investigación sobre aneuploidía y desarrollo nos han confirmado la necesidad de evaluar todo el componente cromosómico del embrión. En los últimos años se ha dedicado un gran esfuerzo a adaptar plataformas de diagnóstico de DNA genómico a célula única. Finalmente, parece ser que el esfuerzo está culminando con la aparición simultánea de varias plataformas de *microarrays* que permiten el diagnóstico de todos cromosomas, (aCGH-Bacs, aCGH-Oligos, SNP's). La principal ventaja que supone el uso de *microarrays* es la eliminación de las limitaciones que nos suponía la técnica de FISH. Si bien es cierto que cada plataforma tiene sus pros y sus contras, los resultados que se están obteniendo son bastante homogéneos.

La elección del *microarray* de aCGH 24sure (Bluegenome) se debe a la siguiente pregunta: ¿Qué estamos buscando? ¿Qué queremos detectar?. En el caso del DGP de aneuploidía aplicado a reproducción, buscamos poder detectar pérdidas y ganancias de cromosomas o partes sustanciales de estos cromosomas. 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 rasgos fenotípicos, ni ningún resultado que pudiera ser éticamente cuestionable (como enfermedades de aparición tardía, predisposición al cáncer,...), así como

tampoco desequilibrios de significado incierto. Esta aplicación es todavía muy reciente, y por lo tanto debemos ser muy cautos a la hora de informar, puesto que aún no existe experiencia suficiente sobre cómo interpretar los resultados a nivel de célula única embrionaria.

Por otro lado, los buenos resultados preliminares obtenidos mediante la biopsia de blastocisto y transferencia en ciclo posterior nos hacen sugerir que éste es el camino a seguir. El hecho de que un embrión llegue a blastocisto ya nos demuestra "per se" una más elevada capacidad de implantación que el resto de la cohorte. Si además podemos elegir de entre los blastocistos, el que presenta la dotación cromosómica normal, la selección del embrión con máximo potencial implantatorio aumenta. De hecho, los resultados nos muestran que, independientemente de la edad materna, una vez conseguido un blastocisto y diagnosticado como normal, el porcentaje de embarazo resultante se mantiene independientemente de la edad de la paciente. También hay que tener en cuenta la posibilidad de que la transferencia en un ciclo asincrónico, en un útero más receptivo y menos sometido al estrés de la estimulación hormonal sea beneficioso y contribuya a aumentar las posibilidades de embarazo. Pero para poder aplicar el DGP-AS en estadio de blastocisto, ya sea en ciclo fresco o asincrónico, se nos presenta un reto muy importante: no sólo conseguir optimizar las técnicas de diagnóstico genético preimplantacional, sino también las condiciones de estimulación hormonal y cultivo en el laboratorio para poder obtener unas tasas de formación de blastocisto elevadas que nos permitan llevar a cabo esa doble selección embrionaria. Así pues, la identificación del embrión con máxima capacidad implantatoria nos permitirá, no sólo ayudar a las pacientes con riesgo de generar embriones anormales, sino también disminuir las tasas de embarazos múltiples mediante la transferencia de un solo embrión.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cohen J, Wells D, Munné S Removal of 2 cells from cleavage stage embryos is likely

CR	NºEVENTOS											total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
8	2	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	7
1	2	1	3	1	0	1	0	1	0	0	0	9
6	0	1	1	0	0	2	5	0	0	0	0	9
14	1	2	5	0	0	0	1	0	0	1	0	10
20	1	1	0	4	0	0	2	1	1	0	0	10
3	0	0	3	1	0	2	2	1	1	1	0	11
10	1	1	4	1	0	1	0	2	0	1	0	11
4	1	4	2	1	0	2	0	2	0	0	0	12
12	0	1	2	3	0	1	3	2	1	0	0	13
5	3	3	0	1	0	4	2	0	0	1	0	14
7	2	5	1	1	0	1	3	0	0	1	0	14
9	3	0	3	4	0	1	1	2	1	0	0	15
2	2	4	3	1	0	3	2	0	1	0	0	16
11	1	4	2	5	0	1	1	0	1	1	0	16
XY	4	1	2	0	0	2	3	3	1	1	0	17
17	3	4	4	3	0	3	3	0	0	1	0	21
18	5	5	5	2	0	0	3	1	1	1	0	23
13	5	7	5	3	0	2	1	0	0	1	0	24
15	3	3	7	7	0	1	1	2	1	0	0	25
19	9	4	8	2	0	3	2	1	0	0	0	29
21	6	7	10	2	0	2	3	2	0	0	0	32
16	12	6	6	7	0	1	0	1	0	0	0	33
22	9	5	14	2	0	3	2	0	0	0	0	35

Tabla 3. Eventos aneuploides según número y cromosoma implicado

to reduce the efficacy of chromosomal tests that are used to enhance implantation rates. *Fertil Steril*. 2007 Mar;87(3):496-503. Epub 2006 Dec 4.

Cohen J, Grifo JA. Multicentre trial of preimplantation genetic screening reported in the *New England Journal of Medicine*: an in-depth look at the findings. *Reprod Biomed Online*. 2007 Oct;15(4):365-6.

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, Colls P, Sánchez-García J, Escudero T, Prates R, Ketterson K, Wells D, Munné S.

Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertil Steril*. 2011 Mar 1;95(3):953-8. Epub 2010 Oct 25.

Harper JC, Harton G. The use of arrays in preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertil Steril*. 2010 Sep;94(4):1173-7. Epub 2010 Jun 25. Review.

Hellani A, Abu-Amero K, Azouri J, El-Akoum S. Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in PGS-aneuploidy screening. *Reprod Biomed Online*. 2008 Dec;17(6):841-7.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992 Oct 30;258(5083):818-21.

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.

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.

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, Gianaroli L, Tur-Kaspa I, Magli C, Sandalinas M, Grifo J, Cram D, Kahraman S, Verlinsky Y, Simpson JL. Substandard application of preimplantation genetic screening may interfere with its clinical success. *Fertil Steril*. 2007 Oct;88(4):781-4.

Rius M, Obradors A, Daina G, Cuzzi J, Marqués L, Calderón G, Velilla E, Martínez-Passarell O, Oliver-Bonet M, Benet J, Navarro J. Reliability of short comparative genomic hybridization in fibroblasts and blastomeres for a comprehensive aneuploidy screening: first clinical application. *Hum Reprod*. 2010 Jul;25(7):1824–35. Epub 2010 May 19.

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.

Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, Munne S, Katz-Jaffe MG, Wells D. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertil Steril*. 2010 Oct;94(5):1700–6. Epub 2009 Nov 25.

Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science*. 1996 Jul 26;273(5274):494-7.

Simpson JL. What next for preimplantation genetic screening? Randomized clinical trial in assessing PGS: necessary but not sufficient. *Hum Reprod*. 2008 Oct;23(10):2179–81. Epub 2008 Jul 9.

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* 2010; 88:S1.

Verlinsky Y, Cieslak J, Freidine M, Ivakhnenko V, Wolf G, Kovalinskaya L, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, et al. Pregnancies following pre-conception diagnosis of common aneuploidies by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod*. 1995 Jul;10(7):1923–7.

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.



DGP para todos los cromosomas*

Con esta nueva técnica se **detectan** más **anomalías** y se **mejoran** las posibilidades de **embarazo**.



Nuevo servicio!!!

ESTUDIOS GENÉTICOS PARA EL SCREENING DE DONANTES:

Fibrosis quística
(50 mutaciones* + polimorfismo TN)
Estudio de X-Frágil

www.pgdcem.com



Madrid y Barcelona -



Chicago - USA

pgd@pgdcem.com

ESTANDARIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR AL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL (DGP)

Esther Fernández García
Geniality Diagnóstico Genético, Madrid
e-mail: efgarcia@geniality.es

INTRODUCCIÓN

EVOLUCIÓN DEL DGP

El Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) permite analizar los embriones obtenidos mediante fecundación in vitro (FIV), en busca de alteraciones cromosómicas o enfermedades genéticas graves, seleccionando aquellos embriones sanos o cromosómicamente normales, antes de la transferencia al útero materno y por tanto, antes de que se haya producido la implantación. Esta técnica representa para las parejas portadoras de alteraciones genéticas graves, la única alternativa a la interrupción del embarazo después de un Diagnóstico Prenatal (DP) de feto afecto.

En 1990 se publica el primer embarazo obtenido mediante DGP, en una pareja portadora de enfermedad ligada al sexo (Handyside et al., 1990). Desde entonces han pasado ya más de dos décadas, durante las cuales esta tecnología, utilizada por primera vez para seleccionar el sexo del embrión, ha ido ampliando sus indicaciones tanto en enfermedades monogénicas como anomalías cromosómicas estructurales, siendo una técnica consolidada y de aplicación rutinaria en muchos centros de Reproducción Asistida, donde esta técnica es especialmente importante debido a la frecuente asociación entre la esterilidad y los factores genéticos.

Uno de los aspectos diferenciales del DGP, son aquellas indicaciones que nunca habían sido contempladas en el DP y que debido a las características de la técnica pueden ser defendidas desde un punto de vista ético. Estas nuevas indicaciones han sido objeto de modificación de leyes, como es el caso de la Ley Española (Ley 14/2006) sobre Reproducción Asistida. Enfermedades como el Huntington, donde el DGP puede

aplicarse en pacientes presintomáticos, abren la puerta a otras enfermedades de aparición tardía como el Alzheimer, pacientes portadores de genes con predisposición al cáncer (BRCA1, BRCA2) (Goossens et al., 2008), así como el DGP que implica la selección de embriones de acuerdo a su HLA, de manera que los niños nacidos de estos ciclos de DGP pueden ser donantes de células madre para su hermano enfermo (Verlinsky et al., 2001).

Sin embargo el DGP tiene en la actualidad retos a los que enfrentarse, como es el diagnóstico de enfermedades mitocondriales. Hasta la fecha se han intentado un número limitado de casos, debido a la dificultad de predecir la carga de mutación en el embrión (depleción mitocondrial) y su efecto clínico (Bredenoord et al., 2008).

ASPECTOS TÉCNICOS DEL DGP

TRA Y BIOPSIA EMBRIONARIA

Todos los embriones analizados en el DGP provienen de técnicas de reproducción asistida, donde las pacientes se someten a una estimulación ovárica controlada, con el fin de obtener un elevado número de ovocitos, que serán denudados para evitar contaminaciones con células maternas durante el proceso de DGP. Estos ovocitos son microinyectados (ICSI) para evitar fallos inesperados de fecundación (Staessen et al., 1999) y prevenir posibles contaminaciones con espermatozoides que queden adheridos a la zona pelúcida (ZP) (Liebaers et al., 1998; Thornhill et al., 2005).

El proceso de biopsia implica dos pasos, abrir la ZP y extraer la célula. Para ello se pueden utilizar tres diferentes métodos, el mecánico con una fina aguja, el químico con ácido de Tyrode's y mediante la técnica del Laser, para luego extraer la célula mediante extrusión o aspiración del corpúsculo

polar (CP) o del blastómero y herniación de las células del trofoectodermo (TE). Las diferentes técnicas de biopsia, aparecen extensamente explicadas en una revisión de De Vos and Van Steirteghem publicada en el año 2001.

La Biopsia del primer y segundo CP, se puede realizar sin dañar las tasas de fecundación y división posterior del ovocito. Su utilidad está limitada a la identificación de los desequilibrios cromosómicos numéricos y enfermedades moleculares de origen materno (Verlinsky and Kuliev, 2003), y en algunos casos para análisis de segregación previo al proceso de DGP (Spits et al., 2006), siendo la única opción en aquellos países donde no está permitido el diagnóstico en embriones.

La biopsia de uno o dos blastómeros del embrión, es la técnica mayoritariamente utilizada. Para ello se deja en cultivo al embrión hasta el día +3 post inseminación (6 o más células). En cuanto a la eficacia del diagnóstico, existen dos tendencias a la hora de realizar la biopsia, una a favor de la biopsia de una blastómera (Cohen et al., 2007), menos perjudicial para el embrión, y la otra a favor de la biopsia de dos blastómeras, que se ha podido comprobar que no afecta a la capacidad de desarrollo a estadio de blastocisto del embrión (Staessen et al., 2004) y puede aumentar la eficacia de los análisis realizados con la PCR (Goossens et al., 2008a).

La biopsia del embrión en estadio de blastocisto, se realiza en el día +5 de cultivo post inseminación. En este caso, aunque se tienen más células para el diagnóstico, hay que tener en cuenta que solo la mitad de los embriones preimplantacionales evolucionan in vitro hasta este estadio (Van Landuyt et al., 2005) y que además contamos con poco tiempo para dar el resultado del diagnóstico, ya que la transferencia

embrionaria se realiza en día +5 o +6. Una posible solución es la congelación de los embriones, aunque hay que tener en cuenta que los embriones biopsiados presentan una tasa de supervivencia menor, debido posiblemente a la abertura de la ZP (Magli et al., 1999, 2006; Joris et al., 1999; Stachecki et al., 2005). La introducción de la técnica de vitrificación en este campo hace más realista esta situación (Escribá et al., 2008).

ANÁLISIS GENÉTICO

PCR Y MÉTODOS POST-PCR

La técnica más común utilizada en el DGP para enfermedades monogénicas es la PCR, aunque en algunos casos la hibridación in situ fluorescente (FISH) puede ser de utilidad en el análisis de grandes deleciones, como es el caso de la Distrofia Muscular de Duchenne y Becker. Cuando utilizamos la PCR en el DGP de enfermedades monogénicas, nos encontramos con una problemática asociada inexistente en el análisis genético convencional con esta misma técnica: la cantidad y calidad de ADN obtenida de una **sola célula** (Harper et al., 2002). Por este motivo ha sido necesario invertir un largo periodo de tiempo para lograr un protocolo de trabajo ajustado a las nuevas condiciones de la PCR, sin perder de vista la contaminación con ADN exógeno y problemas específicos como el *allele drop out* (ADO).

A lo largo de estos años se han utilizado numerosas variantes de la PCR y detección alélica a nivel de una sola célula. La mayoría de estos métodos, como el análisis de heteroduplex tradicionalmente utilizado para la detección de la mutación c.1522 1524del, de la Fibrosis Quística (FQ) (Handyside et al., 1992; Ray et al., 1998, Lissens and Sermon, 1997), han quedado en desuso y han sido reemplazados por la PCR fluorescente, técnica por excelencia utilizada en DGP de enfermedades monogénicas desde hace varios años (Thornhill et al., 2005). La PCR fluorescente se basa en el marcaje en su extremo 5' de uno de los *primers* y el análisis del producto de la PCR en un secuenciador automático. Es una técnica muy sensible que permite la detección simultánea de varios

amplicones. Tras la amplificación por PCR se realiza la discriminación alélica, que en el caso más simple se basa en el tamaño de los fragmentos.

Las endonucleasas de restricción han sido utilizadas ampliamente en el DGP, para distinguir entre dos alelos, uno mutado y el normal. O para detectar los diferentes alelos de un SNP, *single nucleotide polymorphism*, en lugar de utilizar RFLP, *restriction fragment length polymorphism*. Por ejemplo en DGP para FQ (Goossens et al., 2000), beta-thalassemia y anemia de células falciformes (De Rycke et al., 2001), Síndrome de Marfan (Spits et al., 2006a) o para la detección de polimorfismos (Ioulianos et al., 2000).

En la actualidad las endonucleasas de restricción están siendo reemplazadas por la minisequenciación. Los *primers* para la minisequenciación están diseñados para anillar una base antes del sitio diana y elongar un solo dideoxinucleótido. Los cuatro diferentes dideoxinucleótidos están marcados con diferentes fluorocromos y los productos de la minisequenciación pueden distinguirse en un sistema de secuenciación de ADN automático. Esta técnica es muy versátil y ha sido ampliamente utilizada en la detección de mutaciones y SNP (Cram et al., 2003; Fiorentino et al., 2003, 2004; Spits et al., 2005).

La PCR cuantitativa a tiempo real es uno de los últimos desarrollos en PCR; el principal uso de esta técnica es cuantificar con exactitud el nº de copias de un determinado amplicón presentes en una muestra original. En el ámbito del DGP, esta tecnología se presenta como prometedora para el diagnóstico de enfermedades mitocondriales, donde es crucial para determinar la proporción del genoma mutado y del salvaje (Rice et al., 2002).

ADO

Se define como ADO, a la **no amplificación** al azar de uno de los dos alelos presentes en una muestra heterocigota. Este fenómeno puede acarrear errores diagnósticos en el DGP si un embrión heterocigoto es diagnosticado como homocigoto. ELADO

tiene una implicación especialmente importante en enfermedades autosómicas dominantes, donde un embrión afecto podría llegar a ser transferido. Se han realizado numerosos estudios en un intento de dilucidar los factores que influyen en la aparición del ADO y encontrar maneras de evitarlo o disminuir en lo posible su aparición. Se ha sugerido como causa una lisis imperfecta de la célula o una temperatura de desnaturalización inadecuada. De ahí que hayan sido muchos los estudios encaminados a investigar diferentes métodos de lisis celular y pasos desnaturalizantes (Sermón et al., 1995; Rayand Handyside, 1995, El-Hashemite and Delhanty, 1997; Verlinsky and Kuliev, 1998; Thornhill et al., 2001.; Piyamongkol et al., 2003). Existe actualmente el consenso de que los mejores métodos de lisis son la lisis alcalina y la lisis con proteínasa K-SDS (Thornhill et al., 2005). Por el contrario, se ha sugerido como una posible causa de ADO y amplificación preferencial (PA) la degradación del ADN, posiblemente más frecuente en los embriones pobres en morfología y en blastómeros con un núcleo claro (Cui y Matthews, 1996; Thornhill et al., 2001; Piyamongkol et al., 2003, Goossens et al., 2008b)

CONTAMINACIÓN

La PCR de una sola célula tiene un riesgo elevado de contaminación debido principalmente al alto número de ciclos que tienen que realizarse durante el proceso de PCR y a la limitada cantidad de ADN de partida. Por ello, para evitar la contaminación, ha sido necesario adoptar una serie de medidas en los laboratorios que trabajamos en DGP mediante técnicas de PCR. Entre ellas, la separación física de los reactivos y productos de la PCR de cualquier fuente de ADN, la esterilización de los reactivos, hacer alícuotas de los reactivos de PCR para disminuir el número de muestreos de un solo tubo, trabajar en campanas de flujo laminar, utilizar bata, mascarilla y guantes desechables, limpieza de todas las superficies de trabajo con detergentes degradantes de ADN, utilizar UV en las campanas, y basarse en técnicas, como la PCR multiplex, que permiten detectar cualquier contaminación.

MARCADORES Y PCR MULTIPLEX

La PCR multiplex es una co-amplificación de diferentes *loci* en una misma reacción de PCR. Esta técnica es la que se utiliza por excelencia en el DGP de enfermedades monogénicas, ya que incluye la amplificación de al menos dos marcadores polimórficos localizados intragénicos o cercanos al gen, pudiendo además incluir la mutación. Los estudios de informatividad realizados antes del DGP nos permiten determinar *a priori* los alelos esperados en el embrión y qué alelos están segregando con la mutación. La PCR multiplex nos da suficiente información para detectar los ADO, la posible contaminación (Pickering et al., 1994; Findlay et al., 1995), y es perfecto para el diagnóstico, ya que una vez tengamos el haplotipo ligado a la mutación podemos realizar el diagnóstico de forma indirecta analizando la presencia o ausencia del alelo ligado en el embrión sin necesidad de detectar la mutación. Esta opción abre la posibilidad de aplicar un mismo estudio a diferentes parejas que cursan con mutaciones privadas para una enfermedad genética, como puede ser la Neurofibromatosis tipo 1, sin tener que diseñar el estudio de la mutación en cada caso. Aunque esto no signifique que utilicemos los mismos marcadores para cada pareja, ya que dependerá del estudio previo de informatividad. Por otra parte, en la PCR multiplex, utilizamos marcadores que flanquean a la mutación y podemos detectar posibles eventos de recombinación. En el caso de las mutaciones *de novo*, la pareja necesita tener un hijo afecto vivo, o en su defecto muestra de ADN del aborto terapéutico (IVE), si es el caso. Si no fuera así, el estudio se puede llevar a cabo analizando la mutación puntual junto con los marcadores.

AMPLIFICACIÓN DE GENOMA COMPLETO O WHOLE GENOME AMPLIFICATION (WGA)

La cantidad de ADN de partida de una sola célula es un paso limitante en el DGP. Para poder solventar este problema, se utiliza la amplificación de genoma completo (WGA). El objetivo de introducir esta técnica es generar una nueva muestra indistinguible de la original pero con una mayor concentración de ADN.

El primer método de WGA fue descrito en 1992 y estaba basado en el principio de la PCR. Zhang et al., desarrollan la PCR primer extensión (PEP). Telenius et al., desarrollan la PCR con oligos degenerados (DOP-PCR). La principal desventaja de la WGA es la generación de artefactos de amplificación no específicos (Cheung and Nelson, 1996), una cobertura incompleta de los *loci* (Paunio et al., 1996), la ineficacia en la amplificación de microsátelites (Wells et al., 2000), así como la generación de ADN de menos de 1KB de longitud que limitan su aplicación (Telenius et al., 1992; Zhang et al., 1992).

Debido a estas limitaciones, se hacía necesaria la incorporación de un método de WGA que nos permitiera la amplificación del ADN de una sola célula, con una alta fiabilidad y el diagnóstico de cualquier enfermedad monogénica mediante una PCR multiplex.

El MDA (*Multiple displacement amplification*) es el mejor método de WGA utilizado en la amplificación de muestras biológicas que contienen muy poca cantidad de ADN (Dean et al., 2002), y ha supuesto toda una revolución en el diagnóstico de una sola célula. Esta técnica no está basada en la PCR, sino en una amplificación isotérmica que utiliza hexámeros que anillan al azar en el ADN desnaturalizado seguido de la síntesis a lo largo de la cadena de ADN a una temperatura constante, catalizado por la polimerasa Phi 29 que permite conseguir al final del proceso de 20-30 µg de ADN partiendo de 1 a 10 copias de ADN (Handyside et al., 2004; Ali Hellani et al., 2004).

La principal ventaja del MDA es que posibilita la combinación de diferentes indicaciones en un mismo ciclo de DGP, como el análisis de la mutación, de marcadores polimórficos y *screening* de aneuploidías (hibridación genómica comparada (CGH), *array-CGH* o el análisis de *short tandem repeat* (STRs)), así como el estudio combinado de mutación y HLA en el embrión (Handyside et al., 2004). Otra ventaja del MDA, es que nos permite determinar los haplotipos parentales en aquellas parejas que no cuenten con un

embarazo previo o muestra de ADN de un hijo afecto, con el estudio mediante MDA de un espermatozoide (Jiang et al., 2005) o del corpúsculo polar. El mayor inconveniente descrito del MDA es la alta frecuencia de ADO y la amplificación preferencial (AP) (Spits et al., 2006b), que se han estimado en un 25% (Burllet et al., 2006; Renwick et al., 2006).

Presentamos la estandarización de las técnicas de genética molecular aplicadas al análisis del DGP, que nos permiten en la actualidad abordar el diagnóstico genético preimplantacional de cualquier enfermedad monogénica, únicamente con las limitaciones propias de un estudio familiar de segregación de una enfermedad genética.

MATERIAL Y MÉTODOS

Presentamos los resultados obtenidos en 37 ciclos de DGP realizados por 27 parejas portadoras de 11 enfermedades monogénicas: Atrofia Muscular espinal; Hemofilia; CADASIL; 11 Enfermedad de Huntington; Exostosis Múltiple Hereditaria; Fibrosis Quística; Hiperglicinemia no cetósica; mucopolisacaridosis tipo 1 (s. Hurler); 4 Neurofibromatosis tipo 1; Paraparesia espástica hereditaria; 2 Poliposis Adenomatosa Familiar. Todos los casos han llegado al laboratorio entre el 3º y 4º día de cultivo embrionario y los resultados se han dado en un plazo de tiempo comprendido entre 6 y 36 horas, con el fin de que los embriones pudieran ser transferidos al útero materno en día +5.

Salvo en los casos de "Test de exclusión" correspondientes a la enfermedad de Huntington, donde se han utilizado solamente marcadores polimórficos ligados o no ligados, en los ciclos que presentamos se ha llevado a cabo tanto el análisis de marcadores (STRs), con una media de 5 marcadores incluidos en cada estudio, como el análisis directo de la mutación responsable de la enfermedad. En este periodo se han analizado mediante este protocolo 315 blastómeras de 214 embriones biopsiados en día +3 mediante los 3 métodos de biopsia que se emplean de forma rutinaria: mecánica, Tyrode's y laser, siendo de 1,4 la media de blastómeras biopsiadas por embrión.

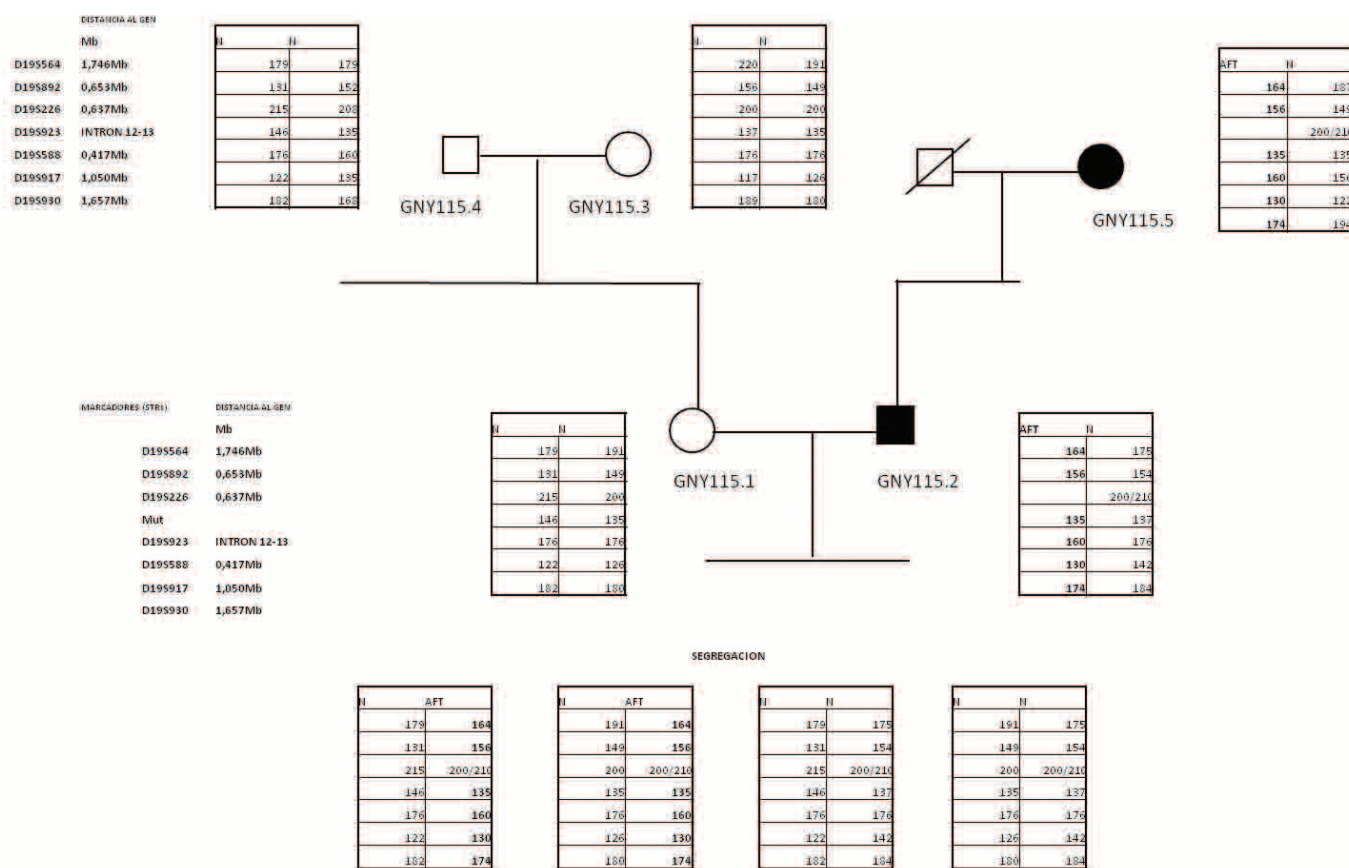


Fig.1 Estudio Informatividad

Se han realizado un total de 1.348 reacciones, 72 de ellas corresponden a la técnica de Minisequenciación (mutación puntual) y 1.276 a marcadores tipo STRs, mutaciones de tipo expansión de tripletes o deleciones. Para las distintas PCR multiplex diseñadas en estos diagnósticos, se han empleado un total de 85 marcadores tipo STR diferentes, de los cuales 14 correspondían a marcadores empleados en el estudio de mutaciones de tipo expansión de tripletes, deleciones o mutaciones puntuales y 71 fueron marcadores polimórficos de tipo STR.

La metodología se aplica en dos etapas:

1-Estudio de Informatividad: Etapa previa al ciclo de DGP en la que se diseñan los marcadores que se emplearán posteriormente en el ciclo de DGP y se realiza el estudio de estos marcadores en la familia, estableciendo la segregación y clasificando los marcadores en informativos, semi-informativos y no informativos. Los marcadores de tipo STR se seleccionan en función de las características que se muestran en la TABLA I:

La finalidad de este diseño es poder incluir en una misma reacción de PCR multiplex el mayor número de marcadores posibles, evitando coincidencias en los tamaños de los productos amplificados.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se lleva a cabo en termocicladores Applied Biosystems Verity™ Thermal Cycler. El volumen final de reacción es de 25 µl por tubo y se utilizó un kit comercial, QIAGEN Multiplex PCR (Cat no. 206145), que nos permite la amplificación de dos o más marcadores en una única reacción. El kit contiene una Master Mix que incluye concentraciones pre-optimizadas de HotStarTaq DNA Polymerase y MgCl₂, dNTPs y buffer de PCR. También contiene

Q-solution, cuya función es modificar la curva de *melting* de los amplificadores de ADN con el fin de facilitar la amplificación conjunta de todos los fragmentos de la PCR multiplex. La concentración de *primers* que añadimos es de 4µM y 100 ng de ADN del probando y sus familiares.

Los marcadores que se emplean para el estudio de mutaciones de expansión de tripletes o deleciones se diseñan y estudian con la misma metodología que si fueran marcadores tipo STR. Los marcadores para las mutaciones puntuales se basan en la reacción de Minisequenciación (SNAPSHOT®, Applied Biosystems) y se diseñan conforme al protocolo recomendado con algunas modificaciones.

TABLA I

Característica	Valor
Cercanía al locus	<2Mb
Posición relativa al locus	Teloméricos y Centroméricos
Unidad de repetición	Dinucleótidos, trinucleótidos, tetranucleótidos
% CG	<60%
Longitud de los <i>primers</i>	17-23
T ^a <i>melting</i>	<60° (y <1° diferencia entre los <i>primers forward</i> y <i>reverse</i>)
Producto amplificado	<250 pb
Anillamientos alternativos	Ausencia
Fluorocromos	6-FAM, VIC

TABLA II

Biopsia Embrionaria ⁽¹⁾	Lisis	Pre-PCR	PCR amplificación de marcadores	post-PCR
Laser	Alcalina	MDA	n Multiplex-PCR (≤3 marcadores)	Análisis de fragmentos
Tyroides			MINISECUENCIACION ⁽²⁾	
Mecánica				

⁽¹⁾ Realizada en todos los ciclos en día +3; Incluye el *tubing* ⁽²⁾ Únicamente en ciclos que incluyen el análisis de mutaciones puntuales.

Para el análisis de los fragmentos amplificados por PCR y el análisis de las mutaciones puntuales, se utilizó un secuenciador automático Applied Biosystems 3130xl, de 16 capilares. El proceso concluye con la selección de los marcadores informativos y semi-informativos para cada pareja (Fig. 1).

2-Diagnóstico Genético

Preimplantacional: Todas las blastómeras fueron biopsiadas en día +3 post fecundación en medio libre de Ca⁺² y Mg⁺², cada blastómera se lava en varias microgotas y se transfieren a un tubo de PCR estéril de 0,2ml en no más de 2µl del mismo medio utilizado para la biopsia (*tubing*). Se prepara entonces un tubo como control negativo por cada embrión biopsiado, que consiste en 2µl de la última gota de lavado.

El traslado al laboratorio se lleva a cabo a T° ambiente (entrada en día+3, o día+4), donde a su llegada y antes de iniciar el proceso, se lleva a cabo la lisis alcalina (200mM NaOH; 50mM DTT) y se someten a una amplificación masiva del ADN (MDA). El protocolo de MDA que empleamos es el recomendado para el GenomiPhi™ V2 DNA Amplification Kit

con pequeñas modificaciones. En la etapa de DGP los protocolos empleados para la PCR multiplex son los descritos en el apartado anterior aplicados a una sola célula y adaptados al producto del MDA. Con el producto del MDA se pueden realizar mediante este protocolo hasta 10 reacciones PCR-Multiplex, que en nuestra experiencia pueden incluir hasta 3 marcadores diferentes, lo que posibilitaría el análisis de hasta 30 marcadores, si fuera necesario.

Para cada una de las etapas se emplean las metodologías descritas en la Tabla II, siendo éste el protocolo estándar para todas las enfermedades monogénicas a partir de la etapa de biopsia.

Criterios diagnósticos: Los controles positivos deberán dar como resultado los haplotipos esperados así como la mutación/mutaciones paternas analizadas y la secuencia normal y el control negativo compuesto por la mezcla de PCR únicamente, nos dará información sobre posibles contaminaciones de los reactivos. La detección de amplificado en el tubo control del embrión preparado en el momento del *tubing*, indican la presencia de contaminantes y demuestra

que los lavados del blastómero han sido insuficientes y no deberían darse como concluyentes los resultados obtenidos en este embrión.

La detección de alelos no paternos en los STRs analizados indica que la contaminación no puede provenir ni de los espermatozoides, ni de las células del cúmulo. En el caso de embriones con tres o más alelos paternos, puede explicarse por contaminación de alelos paternos o por la presencia de un número anormal de cromosomas. Cualquiera de estos embriones debe excluirse de la transferencia.

RESULTADOS

Se analizaron 315 células correspondientes a 214 embriones biopsiados, con un promedio de 6 embriones biopsiados por ciclo, obteniendo diagnóstico en el 94,8% de los embriones (TABLA III).

El número total de marcadores utilizados en el estudio fue de 85 en un total de 1.348 reacciones. La eficacia global de los marcadores utilizados fue del 93,53%. Si separamos entre los marcadores STRs o empleados en el diagnóstico de deleciones (78) y marcadores utilizados en minisequenciación (7), la eficacia encontrada en cada uno de ellos es del 93,20% y del 97,7% respectivamente. Por otro lado, en lo que respecta al ADO, el porcentaje de ADO global obtenido es de 19,11% siendo el porcentaje de ADO encontrado para los STRs del 20,46% y para la minisequenciación del 4,07% (TABLA IV).

Se ha llevado a cabo la transferencia embrionaria en 33 de los 37 ciclos diagnosticados (89,2%) con una media de embrión transferido del 1,8, obteniendo una tasa de embarazo por transferencia del 30,3%. De los 4 ciclos sin transferencia, en 2 de ellos todos sus embriones fueron diagnosticados como afectados y los otros dos no tuvieron evolución embrionaria.

DISCUSIÓN

El Diagnóstico Genético Preimplantacional de enfermedades monogénicas, es una técnica cada vez más solicitada por las

Tabla III

Número de Ciclos	37
Número de Embriones Biopsiados	214
Número de Células analizadas	315
Nº de embriones diagnosticados	203(94,8%)
Número de Embriones sanos	69
Número de Embriones afectados	74
Número de Embriones con riesgo	30
Número de Embriones portadores sanos	18
Número de embriones recombinantes	12(5,9%)
Número de Embriones transferidos	60
Número de Transferencias	33
Media de embriones transferidos	1,8
Nuero de embarazos	10
Tasa de embarazo por transferencia	30,3%

parejas portadoras de enfermedades genéticas graves, ya que les ofrece la oportunidad de realizar el diagnóstico de su descendencia antes de la implantación en el útero materno, evitando así el aborto terapéutico.

El DGP es una técnica que nos permite abordar el estudio de cualquier enfermedad monogénica grave. Esta técnica se ha empleado en los últimos 20 años en el diagnóstico de diversas enfermedades que conforman una lista cada vez más larga, sin embargo también las metodologías empleadas en el diagnóstico de estas enfermedades son muy variadas y en ocasiones, complejas.

El protocolo desarrollado en nuestro laboratorio pretende establecer unas condiciones únicas de diagnóstico para cualquier enfermedad en el que únicamente varían los *primers* o cebadores que serán dependientes del *locus* o enfermedad a estudiar. Esto permite simplificar todo el procedimiento en el diagnóstico de enfermedades monogénicas, acortando los tiempos de respuesta en la fase de estudio de informatividad, puesto que las condiciones son iguales en el estudio de cualquier enfermedad y permite comparar los parámetros de éxito de los diagnósticos (tasa de eficiencia diagnóstica, tasa de *allele drop-out* y fallo de amplificación) independientemente del *locus* analizado.

El empleo del MDA permite realizar un gran número de reacciones con una tasa de eficiencia diagnóstica del 93,53%, superior a la descrita hasta el momento en las recogidas de datos que lleva a cabo la ESHRE de ciclos de DGP por enfermedades monogénicas. Esto cobra especial importancia cuando se trata de realizar un DGP por HLA en combinación o no con el diagnóstico de una enfermedad, o cuando en el DGP está indicado el estudio de dos o más patologías, ya que esto requerirá la inclusión de un gran número de marcadores. Las tasas de *allele drop out* asociadas a este protocolo son similares o incluso inferiores a las descritas en la bibliografía hasta el momento (Spits and Sermon, 2009) y el posible error

TABLA IV

Nº de Marcadores	Eficacia del proceso	%
85	Eficacia Global	93,53
78	Eficacia STRs ⁽¹⁾	93,20
7	Eficacia Minisecuenciación	97,27

Nº de Marcadores	ADO	%
85	Global	19,11%
78	STRs ⁽¹⁾	20,46
7	Minisecuenciación	4,07

(1) Marcadores tipo STR: Incluyen marcadores que se emplean para el estudio de mutaciones consistentes en expansión de tripletes o deleciones y marcadores de tipo short tandem repeat (STRs) o microsatélites

diagnóstico consecuencia de este fenómeno se solventa con la inclusión de una media de 5-6 marcadores informativos o semi-informativos por diagnóstico, lo que garantiza en un 94,8% el resultado diagnóstico del embrión.

La estandarización de los protocolos de diagnóstico genético utilizados en el Diagnóstico Genético Preimplantacional, nos permite ofrecer unos resultados con una alta fiabilidad que queda reflejada en la eficacia conseguida con esta metodología de trabajo. Esta estandarización tiene que empezar en la etapa del estudio de informatividad y desde el momento en que la célula embrionaria es introducida en el tubo de PCR donde se llevará a cabo la lisis celular, la posterior amplificación masiva del ADN mediante la técnica del MDA y las diferentes PCR multiplex que nos permitirán llegar a seleccionar el embrión "sano" para su transferencia al útero materno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bredenoord, A. L., Pennings, G., Smeets, H. J., and de Wert, G. Dealing with uncertainties: ethics of prenatal diagnosis and preimplantation genetic diagnosis to prevent mitochondrial disorders. *Hum. Reprod.Update.* 2008,14:83-94.

Burlet, P., Frydman, N., Gigarel, N., Kerbrat, V., Tachdjian, G., Feyereisen, E., Bonnefont, J. P., Frydman, R., Munnich, A., and Steffann, J. Multiple displacement amplification improves PGD for fragile X syndrome. *Mol.Hum.Reprod.* 2006,12:647-652.

Cheung, V. G., and Nelson, S. F. Whole genome amplification using a degenerate oligonucleotide primer allows hundreds of genotypes to be performed on less than one nanogram of genomic DNA. *Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A.* 1996,93:14676-14679.

Cohen, J., Wells, D., and Munne, S. Removal of 2 cells from cleavage stage embryos is likely to reduce the efficacy of chromosomal tests that are used to enhance implantation rates. *Fertil.Steril.* 2007, 87:496-503.

Cram, D. S., Song, B., and Trounson, A. O. Preimplantation diagnosis of Lesch-Nyhan using mini-sequencing primer extension. *Reprod.Biomed.Online.* 2003,7:342-345.

Cui, K. H., and Matthews, C. D. Nuclear structural conditions and PCR amplification in human preimplantation diagnosis. *Mol. Hum.Reprod.* 1996, 2:63-71.

De Rycke, M., Van de Velde, H., Sermon, K., Lissens, W., De Vos, A., Vandervorst, M., Vanderfaillie, A., Van Steirteghem, A., and Liebaers, I. Preimplantation genetic diagnosis for sickle-cell anemia and for beta-thalassemia. *Prenat.Diagn.* 2001, 21:214-222.

De Vos, A., and Van Steirteghem, A. Aspects of biopsy procedures prior to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat. Diagn.* 2001, 21:767-780.

Dean, F. B., Hosono, S., Fang, L., Wu, X., Faruqi, A. F., Bray-Ward, P., Sun, Z., Zong, Q., Du, Y., Du, J., Driscoll, M., Song, W., Kingsmore, S. F., Egholm, M., and Lasken, R. S. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2002, 99:5261-5266.

- El-Hashemite, N., and Delhanty, J. D. A technique for eliminating allele specific amplification failure during DNA amplification of heterozygous cells for preimplantation diagnosis. *Mol.Hum.Reprod.* 1997,3:975-978.
- Escriba, M. J., Zulategui, J. F., Galan, A., Mercader, A., Remohi, J., and de los Santos, M. J. Vitrification of preimplantation genetically diagnosed human blastocysts and its contribution to the cumulative ongoing pregnancy rate per cycle by using a closed device. *Fertil.Steril.* 2008,89:840-846.
- Findlay, I., Urquhart, A., Quirke, P., Sullivan, K., Rutherford, A. J., and Lilford, R. J. Simultaneous DNA 'fingerprinting', diagnosis of sex and single-gene defect status from single cells. *Hum.Reprod.* 1995,10:1005-1013.
- Fiorentino, F., Biricik, A., Karadayi, H., Berkil, H., Karlikaya, G., Sertyel, S., Podini, D., Baldi, M., Magli, M. C., Gianaroli, L., and Kahraman, S. Development and clinical application of a strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders combined with HLA matching. *Mol.Hum.Reprod.* 2004, 10:445-460.
- Fiorentino, F., Magli, M. C., Podini, D., Ferraretti, A. P., Nuccitelli, A., Vitale, N., Baldi, M., and Gianaroli, L. The minisequencing method: an alternative strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders. *Mol.Hum.Reprod.* 2003,9:399-410.
- Goossens, V., De Rycke, M., De Vos, A., Staessen, C., Michiels, A., Verpoest, W., Van Steirteghem, A., Bertrand, C., Liebaers, I., Devroey, P., and Sermon, K. Diagnostic efficiency, embryonic development and clinical outcome after the biopsy of one or two blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Hum.Reprod.* 2008,23:481-492.
- Goossens, V., Harton, G., Moutou, C., Scriven, P. N., Traeger-Synodinos, J., Sermon, K., Harper, J. C., and European Society of Human Reproduction and Embryology PGD Consortium. 2008. ESHRE PGD Consortium data collection VIII: cycles from January to December 2005 with pregnancy follow-up to October. *Hum.Reprod.* 2006,23:2629-2645.
- Goossens, V., Sermon, K., Lissens, W., Vandervorst, M., Vanderfaeillie, A., De Rijcke, M., De Vos, A., Henderix, P., Van De Velde, H., Van Steirteghem, A., and Liebaers, I. Clinical application of preimplantation genetic diagnosis for cystic fibrosis. *Prenat.Diagn.* 2000,20:571-581.
- Handyside, A. H., Robinson, M. D., Simpson, R. J., Omar, M. B., Shaw, M. A., Grudzinskas, J. G., and Rutherford, A. Isothermal whole genome amplification from single and small numbers of cells: a new era for preimplantation genetic diagnosis of inherited disease. *Mol.Hum.Reprod.* 2004,10:767-772.
- Handyside, A. H., Lesko, J. G., Tarin, J. J., Winston, R. M., and Hughes, M. R. Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. *N.Engl.J.Med.* 1992, 327:905-909.
- Handyside, A. H., Kontogianni, E. H., Hardy, K., and Winston, R. M. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature.* 1990, 344:768-770.
- Harper, J. C., Wells, D., Piyamongkol, W., Abou-Sleiman, P., Apeessos, A., Ioulianos, A., Davis, M., Doshi, A., Serhal, P., Ranieri, M., Rodeck, C., and Delhanty, J. D. Preimplantation genetic diagnosis for single gene disorders: experience with five single gene disorders. *Prenat.Diagn.* 2002, 22:525-533.
- Hellani, A., Coskun, S., Benkhalifa, M., Tbakhi, A., Sakati, N., Al-Odaib, A., and Ozand, P. Multiple displacement amplification on single cell and possible PGD applications. *Mol.Hum.Reprod.* 2004,10:847-852.
- Ioulianos, A., Wells, D., Harper, J. C., and Delhanty, J. D. A successful strategy for preimplantation diagnosis of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency. *Prenat.Diagn.* 2000,20:593-598.
- Jiang, Z., Zhang, X., Deka, R., and Jin, L. Genome amplification of single sperm using multiple displacement amplification. *Nucleic Acids Res.* 2005, 33:e91.
- Joris, H., Van den Abbeel, E., Vos, A. D., and Van Steirteghem, A. Reduced survival after human embryo biopsy and subsequent cryopreservation. *Hum.Reprod.* 1999,14:2833-2837.
- Liebaers, I., Sermon, K., Staessen, C., Joris, H., Lissens, W., Van Assche, E., Nagy, P., Bonduelle, M., Vandervorst, M., Devroey, P., and Van Steirteghem, A. Clinical experience with preimplantation genetic diagnosis and intracytoplasmic sperm injection. *Hum.Reprod.* 1998, 13 Suppl 1:186-195.
- Lissens, W., and Sermon, K. Preimplantation genetic diagnosis: current status and new developments. *Hum.Reprod.* 1997,12:1756-1761.
- Magli, M. C., Gianaroli, L., Fortini, D., Ferraretti, A. P., and Munne, S. Impact of blastomere biopsy and cryopreservation techniques on human embryo viability. *Hum.Reprod.* 1999,14:770-773.
- Paunio, T., Reima, I., and Syvanen, A. C. Preimplantation diagnosis by whole-genome amplification, PCR amplification, and solid-phase minisequencing of blastomere DNA. *Clin.Chem.* 1996, 42:1382-1390.
- Pickering, S. J., McConnell, J. M., Johnson, M. H., and Braude, P. R. Use of a polymorphic dinucleotide repeat sequence to detect non-blastomeric contamination of the polymerase chain reaction in biopsy samples for preimplantation diagnosis. *Hum.Reprod.* 1994, 9:1539-1545.
- Piyamongkol, W., Bermudez, M. G., Harper, J. C., and Wells, D. Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: implications for preimplantation genetic diagnosis. *Mol.Hum.Reprod.* 2003, 9:411-420.
- Ray, P. F., Ao, A., Taylor, D. M., Winston, R. M., and Handyside, A. H. Assessment of the reliability of single blastomere analysis for preimplantation diagnosis of the delta F508 deletion causing cystic fibrosis in clinical practice. *Prenat.Diagn.* 1998, 18:1402-1412.
- Ray, P. F., Conaghan, J., Winston, R. M., and Handyside, A. H. Increased number of cells and metabolic activity in male human preimplantation embryos

- following in vitro fertilization. *J.Reprod. Fertil.* 1995, 104:165-171.
- Renwick, P. J., Trussler, J., Ostad-Saffari, E., Fassihi, H., Black, C., Braude, P., Ogilvie, C. M., and Abbs, S. Proof of principle and first cases using preimplantation genetic haplotyping—a paradigm shift for embryo diagnosis. *Reprod.Biomed.Online.* 2006,13:110-119.
- Rice, J. E., Sanchez, J. A., Pierce, K. E., and Wangh, L. J. Real-time PCR with molecular beacons provides a highly accurate assay for detection of Tay-Sachs alleles in single cells. *Prenat.Diagn.* 2002, 22:1130-1134.
- Sermon, K., Lissens, W., Nagy, Z. P., Van Steirteghem, A., and Liebaers, I. Simultaneous amplification of the two most frequent mutations of infantile Tay-Sachs disease in single blastomeres. *Hum.Reprod.* 1995,10:2214-2217.
- Spits, C., and Sermon, K. PGD for monogenic disorders: aspects of molecular biology. *Prenat.Diagn.* 2009,29:50-56.
- Spits, C., De Rycke, M., Verpoest, W., Lissens, W., Van Steirteghem, A., Liebaers, I., and Sermon, K. Preimplantation genetic diagnosis for Marfan syndrome. *Fertil.Steril.* 2006, 86:310-320.
- Spits, C., Le Caignec, C., De Rycke, M., Van Haute, L., Van Steirteghem, A., Liebaers, I., and Sermon, K. Optimization and evaluation of single-cell whole-genome multiple displacement amplification. *Hum.Mutat.* 2006, 27:496-503.
- Spits, C., De Rycke, M., Van Ranst, N., Joris, H., Verpoest, W., Lissens, W., Devroey, P., Van Steirteghem, A., Liebaers, I., and Sermon, K. Preimplantation genetic diagnosis for neurofibromatosis type 1. *Mol.Hum.Reprod.* 2005,11:381-387.
- Stachecki, J. J., Cohen, J., and Munne, S. Cryopreservation of biopsied cleavage stage human embryos. *Reprod.Biomed. Online.* 2005,11:711-715.
- Staessen, C., Platteau, P., Van Assche, E., Michiels, A., Tournaye, H., Camus, M., Devroey, P., Liebaers, I., and Van Steirteghem, A. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum.Reprod.* 2004, 19:2849-2858.
- Staessen, C., Camus, M., Clasen, K., De Vos, A., and Van Steirteghem, A. Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in sibling oocytes from couples with tubal infertility and normozoospermic semen. *Hum.Reprod.* 1999,14:2474-2479.
- Telenius, H., Carter, N. P., Bebb, C. E., Nordenskjold, M., Ponder, B. A., and Tunnacliffe, A. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics.* 1992,13:718-725.
- Thornhill, A. R., deDie-Smulders, C. E., Geraedts, J. P., Harper, J. C., Harton, G. L., Lavery, S. A., Moutou, C., Robinson, M. D., Schmutzler, A. G., Scriven, P. N., Sermon, K. D., Wilton, L., and ESHRE PGD Consortium. ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)'. *Hum.Reprod.* 2005,20:35-48.
- Thornhill, A. R., McGrath, J. A., Eady, R. A., Braude, P. R., and Handyside, A. H. A comparison of different lysis buffers to assess allele dropout from single cells for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat.Diagn.* 2001, 21:490-497.
- Van Landuyt, L., De Vos, A., Joris, H., Verheyen, G., Devroey, P., and Van Steirteghem, A. Blastocyst formation in in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection cycles: influence of the fertilization procedure. *Fertil.Steril.* 2005,83:1397-1403.
- Verlinsky, Y., and Kuliev, A. Current status of preimplantation diagnosis for single gene disorders. *Reprod.Biomed.Online.* 2003, 7:145-150.
- Verlinsky, Y., Rechitsky, S., Schoolcraft, W., Strom, C., and Kuliev, A. Preimplantation diagnosis for Fanconi anemia combined with HLA matching. *JAMA.* 2001, 285:3130-3133.
- Verlinsky, Y., and Kuliev, A. Progress in preimplantation genetics. *J.Assist. Reprod.Genet.* 1998,15:9-11.
- Wells, D., and Delhanty, J. D. Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Mol.Hum.Reprod.* 2000,6:1055-1062.
- Zhang, L., Cui, X., Schmitt, K., Hubert, R., Navidi, W., and Arnheim, N. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1992, 89:5847-5851.



● ICSI



● IMSI



● Biopsia de cuerpo polar



Ahora también
Incubadores
NBS

Competencia en reproducción asistida

Tanto para sus aplicaciones en ICSI, IMSI, diagnóstico genético preimplantacional o biopsia de cuerpo polar, ¡Eppendorf le ofrece un amplio rango de consumibles y equipamiento para su laboratorio de reproducción!

Tecnologías innovadoras combinadas con un funcionamiento sencillo para poder realizar complejas técnicas de micromanipulación de forma fácil, sencilla y fiable.

Incubadores de CO₂

- Capacidades de 170, 48 y 14 litros
- Sistemas por calentamiento directo
- Amplia gama de opciones

Micromanipuladores TransferMan NK2

- Sistema con joystick integrado con control proporcional para ajuste fino y grueso
- Almacenamiento de posiciones y tecla Home para cambio de capilares

Microinyectores CellTram

- Sistemas de émbolo libres de mantenimiento
- Ergonómicos, fáciles de usar y muy precisos

Para más información visite

www.eppendorf.es/celltech

eppendorf
In touch with life



New Brunswick
an eppendorf company

Eppendorf Ibérica S.L.U. · Avenida Tenerife 2 · Edificio 1 · Madrid · Spain · Tel: +34 91 651 76 94 · Fax: +34 91 651 81 44
E-mail: iberica@eppendorf.es · www.eppendorf.es

Application Support: Tel: +49 1803 666 789 · E-mail: support@eppendorf.com

CINEMATOGRAFÍA PARA EL ESTUDIO DE LA CALIDAD EMBRIONARIA: EMBRYOSCOPE

Javier Herrero, Alberto Tejera, María Cruz, Marcos Meseguer
IVI Valencia
e-mail: marcos.meseguer@ivi.es

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas el número de niños nacidos gracias a la fecundación in vitro (FIV) ha aumentado gradualmente. Este procedimiento se presenta como el tratamiento más eficaz para la infertilidad, tanto femenina como masculina (Bergh, 2005).

La mejora tecnológica de las herramientas de trabajo junto con los avances en nuestro conocimiento sobre la reproducción asistida ha permitido establecer unas tasas satisfactorias de gestación, pero seguimos arrastrando una tasa de embarazo múltiple demasiado elevada (Nyboe Andersen et al., 2004). En la última década, la reducción del número de embriones transferidos ha provocado un descenso en el número de embarazos múltiples. Parece obvio que los dos factores más influyentes en la concepción de una gestación múltiple son el número de embriones transferidos unido a la calidad de los mismos. La transferencia de un único embrión se traduce mayoritariamente en embarazos únicos pero también conlleva un descenso notable en la tasa global de embarazo alcanzada (Bergh, 2005; Nyboe Andersen et al., 2004; Van Royen et al., 1999; Scout et al., 2007). Por este motivo necesitamos desarrollar métodos más exactos y objetivos que nos permitan seleccionar el mejor embrión de la cohorte para transferir basándonos en su calidad sin que esto suponga un descenso en la tasa de gestación (Lopes et al., 2007). Algunas de las claves para estos nuevos procedimientos deben ser la no invasividad de la técnica así como la obtención de información objetiva y cuantificable.

El método no invasivo de rutina más empleado hasta la fecha para determinar la calidad de los embriones es la evaluación morfológica mediante microscopio óptico invertido. Esta técnica es específica, sensible e inocua y además no conlleva demasiadas

complejidades técnicas ni logísticas (Cummins et al., 1986; Scott, 2003; Baczkowski et al., 2004; Lundin et al., 2001; Edwards et al. 1984; Shoukir et al., 1997; Salumets et al., 2001). Son necesarios sistemas de clasificación fiables en cada etapa del desarrollo para poder categorizar la calidad del embrión atendiendo a características morfológicas durante el desarrollo embrionario. Las limitaciones que presenta son la evidente subjetividad asociada al criterio del observador y el propio sistema de evaluación, que concibe el desarrollo embrionario desde un enfoque estático y rígido. Puede que por este motivo sigamos encontrando muchos casos en los que la valoración del embrión no concuerda con los resultados clínicos obtenidos.

Esta tecnología aplicada a la fecundación in vitro nos ha permitido ver y analizar los eventos de la fecundación humana y la embriogénesis. Sin embargo, la preocupación por el bienestar del embrión ha limitado la intensidad de la observación, y el análisis del ritmo de crecimiento y los cambios morfológicos se han deducido en gran medida a partir de la apariencia de los embriones en momentos puntuales, generalmente con muchas horas de diferencia. La evaluación a través de "fotogramas congelados" de los procesos dinámicos de crecimiento necesariamente limitan la información disponible para el observador e inevitablemente puede implicar la pérdida completa de algunos procesos efímeros. Además, la naturaleza gradual de los cambios en la morfología celular puede ocultar algunos procesos que se hacen evidentes cuando se condensan en una imagen con movimiento (Payne et al., 1997).

Diversas publicaciones han analizado la calidad embrionaria apoyándose en el análisis del ritmo de división de los embriones como complemento a la morfología, si bien la mayoría de éstas se han centrado en el examen

de la primera división embrionaria. Las razones por las que existen variaciones en el momento en que se produce esta división no están claras, podría estar relacionado con determinadas condiciones del cultivo o factores intrínsecos del ovocito y del espermatozoide (Sakkas, 2001). Para entender estos artículos hay que definir primero el término división temprana embrionaria, que es aquella que ocurre entre las 25-27 horas post-ICSI dando lugar a un embrión de dos células. El análisis de este parámetro y su impacto en la tasa de gestación en humanos fue publicado por primera vez por el grupo de Edwards en 1984 (Edwards et al., 1984). Posteriormente muchos estudios han hecho uso de este suceso como base de sus publicaciones (Sakkas, 2001; Fenwick et al., 2002; Van Montfoort et al., 2004; Lemmen et al., 2008; Scott et al., 2008). Todos ellos coinciden en que la transferencia de embriones con división temprana da lugar a mayores tasas de implantación y embarazo; sin embargo, la mayoría de los estudios no analizaron transferencias puras de embriones con este patrón de división, por lo que se incluyeron ciclos en los que se transfirieron embriones con división temprana y sin ella. Esto nos lleva a no poder afirmar con seguridad si las tasas de implantación y embarazo obtenidas pueden ser atribuidas al efecto de la división temprana. Varias de estas publicaciones han demostrado una correlación positiva entre la división temprana y variables como el número de células y la morfología adecuada.

Cabe destacar el estudio llevado a cabo por el grupo de Van Montfoort en el año 2004, en el que analizó 165 transferencias únicas comparando embriones con división temprana y división tardía. En el grupo de división temprana la tasa de formación de blastocisto aumentó, obtuvo mayores tasas de gestación y por el contrario la de aborto se redujo (Van Montfoort et al., 2004). El problema de este

estudio una vez más es que la selección del embrión para la transferencia se basó en la morfología y número de blastómeras el día de la transferencia y no en la condición de ser embriones con división temprana.

La crítica a todos estos trabajos y por extrapolación a los métodos actuales de evaluación embrionaria radica en la observación del embrión en momentos predeterminados para confirmar si se ha producido un determinado fenómeno, pero no son capaces de establecer el momento exacto en que éste ha ocurrido. Por otro lado, estos métodos se basan en características cualitativas, de presencia o ausencia, pero no son capaces de utilizar el timing embrionario como una herramienta cuantitativa, es decir, establecer la importancia no sólo de que haya ocurrido el fenómeno sino de en qué preciso momento haya ocurrido. La evaluación puntual del embrión, por tanto, se traduce en una enorme pérdida de información de todo lo que ocurre antes y después del momento analizado. La solución a esta limitación en la información debido a las herramientas estáticas que poseemos pasa por el desarrollo de nuevas técnicas que sean capaces de registrar y concebir todo el desarrollo embrionario como el proceso dinámico que es.

TECNOLOGÍA TIME-LAPSE APLICADA A LA EVALUACIÓN EMBRIONARIA

Bajo el nombre de análisis de imagen, *time-lapse* o cinematografía han aparecido en el mercado en los últimos años nuevos equipos de captura de imagen acoplados de diferente manera a microscopios. Paralelamente al avance digital se han desarrollado nuevos y más potentes programas de procesamiento de imágenes, facilitando el uso de este tipo de herramientas que anteriormente estaban restringidas a complejos y costosos equipos dotados de potentes ordenadores.

Nagy et al. en 1994 describieron el desarrollo temporal de la fecundación en ovocitos humanos después de la microinyección intracitoplasmática. Los ovocitos se observaron cada 2 horas, pero los investigadores reconocieron que hubo problemas a la hora de identificar el primer y segundo corpúsculo polar



Figura 1. Fotografía de la versión D de EmbryoScope™

y el pronúcleo masculino y femenino durante las observaciones. Además, no es posible determinar el momento exacto de eventos como la descondensación de la cabeza espermática, extrusión del segundo corpúsculo polar y formación de los pronúcleos usando este sistema de observaciones de puntos fijos. La cinematografía mediante video *time-lapse* supera las limitaciones que presenta la observación intermitente, gracias a la obtención de imágenes con mayor resolución y de forma continua en las que los distintos componentes celulares se pueden reconocer y seguir durante todo el período grabado. Los autores desarrollaron un sistema que mantiene los ovocitos y embriones bajo condiciones de cultivo convencionales y graba imágenes de video *time-lapse* de alta calidad usando óptica de contraste interdifereencial Nomarski. Los ovocitos inseminados por ICSI son ideales para este tipo de estudios, ya que las células del cumulus han sido eliminadas previamente, los tipos citoplasmáticos de los ovocitos son claramente visibles y el momento exacto de la penetración espermática es conocido (Payne et al., 1997).

El grupo de Lemmen, en el año 2008, implementó el cultivo embrionario con un sistema de captura de imágenes *time-lapse* consistente en un microscopio Nikon Diaphot 300 con cámara en un sistema cerrado

(Visiopharm, Hørsholm, Denmark), con el objetivo de identificar marcadores relacionados con calidad embrionaria e implantación. Observaron que los embriones que implantan tienen una desaparición de pronúcleos y primera división más tempranas así como un mayor número de células en día 2 de desarrollo embrionario. Asimismo existía una asociación entre la sincronía en la aparición de los núcleos en las dos blastómeras formadas después de la primera división y una mayor tasa de embarazo (Lemmen et al., 2008).

Más recientemente se ha desarrollado un sistema basado en los incubadores convencionales tri-gas que incorpora un sistema de captura de imagen cuyo nombre comercial es EmbryoScope™ (Unisense Fertilitech, Aarhus, Denmark) (figura 1). Los primeros modelos se basaban en la toma de imágenes en tiempo real y el registro de su consumo de oxígeno mediante microsensores. El conjunto de estas dos aplicaciones generaba unas determinaciones únicas relacionando la actividad metabólica con los tiempos de división. Las versiones actuales del sistema se centran en la captura de imágenes con alta resolución mediante tecnología *time-lapse*. Se puede visualizar el estado actual del embrión sin necesidad de sacar la placa del incubador minimizando de este

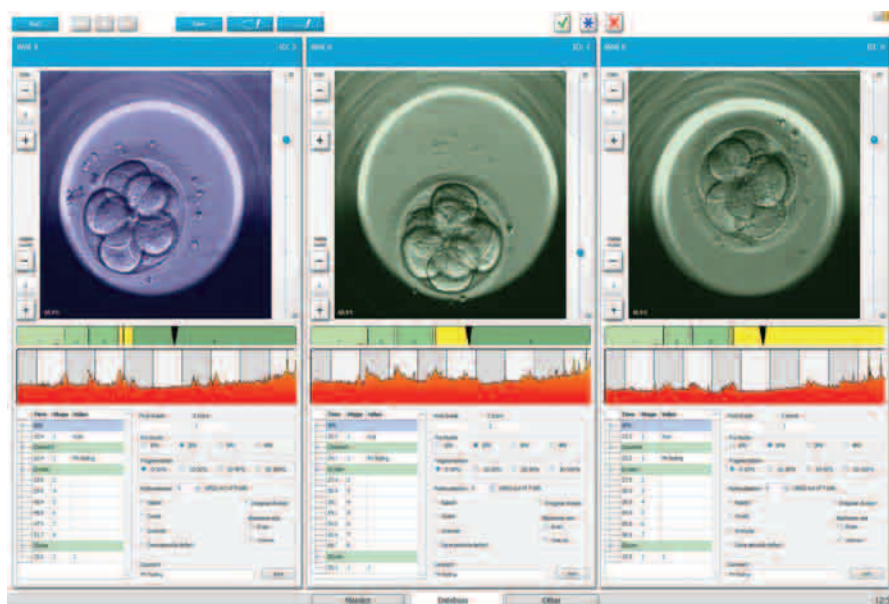


Figura 2. Análisis del desarrollo embrionario de 3 embriones de una cohorte embrionaria mediante EmbryoScope. El programa permite realizar anotaciones en cada fotograma del video quedando vinculadas a ese tiempo exacto.

modo la manipulación de los embriones, lo que podría ayudar a mantener intacto el potencial de cada embrión.

La suma de fotogramas genera una grabación que permite visualizar el desarrollo embrionario de manera continua (figura 2). De este modo se registra cada uno de los eventos que suceden durante el cultivo, aportando precisión, certeza y objetividad al criterio del observador (Lemmen et al., 2008). Esto supone un gran avance conceptual en la valoración de la calidad embrionaria, al permitir evaluar procesos del desarrollo embrionario frente a estadios del embrión.

El uso de este sistema de trabajo en el laboratorio de fecundación *in vitro* implica mejoras en cuanto a las condiciones de cultivo de los embriones y la cantidad de información que obtenemos de ellos, lo que debería traducirse en una mejora de los resultados clínicos. No obstante se presentan otra serie de beneficios en lo que se refiere a la rutina de trabajo del laboratorio como el ahorro de tiempo al disminuir considerablemente la manipulación de los embriones y no tener que acceder al laboratorio para su evaluación; la disminución de los costes de producción al reducir el consumo de medios, placas de cultivo, aceite mineral y gases medicinales; y de espacio por el tamaño del incubador. Sin embargo, esta tecnología plantea también algunas

desventajas como la formación necesaria para reducir el tiempo requerido para la preparación de las placas o para la realización de las anotaciones en el visor de embriones, o bien problemas técnicos como la eliminación de burbujas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las condiciones de cultivo en el EmbryoScope son programables de la misma forma que en los incubadores convencionales. Dispone de un programa que registra continuamente los valores de temperatura y concentración de gases en tiempo real, generando una gráfica que refleja sus fluctuaciones durante el tiempo de incubación. Los archivos con los parámetros de incubación registrados de cada paciente son almacenados automáticamente para poder ser revisados en cualquier momento.

El EmbryoScope tiene una capacidad de 6 placas especiales con tapa estéril. Cada placa posee un pocillo central común que consta de 12 pocillos individualizados de 25 µl cada uno, pudiendo cultivarse y analizarse un máximo de 72 embriones simultáneamente. Cada pocillo individual presenta una depresión central de unos 250 µm de diámetro llamada micropocillo.

CAPTURA DE IMAGEN EN EL EMBRYOSCOPE

La obtención de imágenes se inicia inmediatamente después de

haber introducido las placas en el EmbryoScope. El tiempo se registra tomando como punto de partida el momento de la microinyección espermática. El programa busca automáticamente los pocillos de cada placa y los planos focales más informativos para obtener imágenes de cada embrión.

Las imágenes son capturadas con una cámara monocromática de 1280 x 1024 pixels con óptica Leica de 200 aumentos, obteniendo una resolución final de 3 pixels por micra. La fuente de iluminación consiste en un led rojo, dado que la cámara está diseñada para trabajar con una longitud de onda de 635 nm durante 0,3 segundos por imagen. El tiempo total de exposición a la luz es inferior a 50 segundos por día y embrión. El tiempo necesario por embrión para obtener una imagen es inferior a 10 segundos incluido el enfoque.

El número de planos focales en cada imagen tomada y el intervalo de tiempo entre cada una de ellas es preprogramable pero suele oscilar entorno a los 15 minutos. La suma de fotogramas de cada embrión genera una grabación que permite visualizar el desarrollo embrionario de manera continua permitiendo evaluar los procesos como la aparición y desaparición de pronúcleos, las divisiones embrionarias, fragmentación celular, multinucleación, mediciones del diámetro del ovocito o embrión y grosor de la zona pelúcida en cada momento de la grabación.

ESTUDIOS LLEVADOS A CABO

1. Validación clínica del uso del EmbryoScope como incubador para los ciclos de reproducción asistida

Nuestro grupo evaluó si el EmbryoScope (ES) proporciona un ambiente adecuado para el desarrollo embrionario de calidad similar al proporcionado por el incubador convencional (IC). Para ello comparamos un total de 77 ciclos de ICSI llevados a cabo en ES y se compararon con 279 ciclos de ICSI en IC, todos ellos realizados en el Instituto Valenciano de Infertilidad de Valencia. El análisis consistió en un estudio retrospectivo de cohortes emparejadas, es decir,

por cada paciente cuyos embriones obtenidos por ICSI se introdujeron en ES, se buscó otra u otras pacientes con los mismos criterios de inclusión y exclusión cuyos embriones se habían introducido en el IC. Se compararon las Tasas de Gestación Clínica (TGC) y la Tasas de Gestación Evolutiva (TGE) en las pacientes incluidas en ambos sistemas. Se comprobó que los valores obtenidos de las variables analizadas en ambos grupos no diferían significativamente para evitar que alteren las comparaciones de TGC y TGE en ambas categorías. Estas variables fueron: edad media de las pacientes, número de ovocitos recuperados, tratamiento hormonal utilizado, número de embriones transferidos, porcentaje de abortos y porcentaje de embriones de buena calidad.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico mediante el test de Fischer, utilizando el paquete estadístico SPSS 17. Se consideraron estadísticamente significativos los datos con p-valor <0,05.

2. Descripción de los tiempos exactos de los principales eventos del desarrollo embrionario mediante el análisis por *time-lapse* de 1340 embriones humanos

Se monitorizó el desarrollo de 1340 embriones de 210 parejas incluidas en nuestro programa de donación de óvulos desde septiembre de 2009 hasta noviembre de 2010. El único

criterio de exclusión para los hombres para este estudio fue la presencia de factor masculino severo (menos de 5 millones de espermatozoides móviles en el eyaculado). Las donantes tuvieron entre 18 y 35 años sin exposición a radiación actual en el pasado o sustancias químicas nocivas, sin consumo de drogas, sin historial familiar de enfermedades hereditarias o cromosómicas y con cariotipo normal. Todas ellas tenían ciclos menstruales normales de 26-34 días de duración, peso normal (MCI 18-28 kg/m²) y sin tratamientos endocrinos (incluidas gonadotropinas y anticonceptivos orales) en los 3 meses precedentes al estudio.

Los eventos seleccionados del desarrollo embrionario fueron las divisiones embrionarias desde el cigoto hasta el embrión de 8 células, la compactación de la mórula y la formación del blastocisto.

3. Determinación de los rangos de tiempo óptimos de eventos clave durante el desarrollo embrionario por medio de cinematografía *time-lapse*.

Se analizó el desarrollo de 885 embriones transferidos de 487 parejas. Se seleccionaron 467 para realizar análisis detallados basándonos en que presentaran un 100% de implantación (n= 111) donde el número de sacos gestacionales confirmados por ultrasonido cuadraba con el número

de embriones transferidos; o 0% de implantación (n= 356) donde no se alcanzó ni embarazo bioquímico. El tiempo se clasificó en cuartiles y se agrupó en 2 categorías; la primera definida por los 2 cuartiles centrales (IN) y la segunda que incluye el resto de datos (OUT). La implantación se comparó entre las 2 categorías por un test Chi-cuadrado. Las variables analizadas fueron; t2 (tiempo de la 1ª división), t3 (tiempo de la 2ª división), t4 (tiempo de la 3ª división), t5 (tiempo de la 4ª división), cc2 (duración del 2º ciclo celular definido como cc2 = t3-t2) y s2 (sincronía entre la 2ª y 3ª división embrionaria definido como s2= t4-t3).

4. Construcción de un modelo multivariable para predecir la implantación basado en el análisis de la morfocinética por *time-lapse*.

Se monitorizó el desarrollo de 247 embriones transferidos de 286 parejas. Todas las parejas se encontraban bajo su primer ciclo de ICSI. De los 522 embriones transferidos seleccionamos 247 basándonos de nuevo en que presentaran un 100% de implantación (n= 61) o 0% de implantación (n= 192). Se identificaron los tiempos exactos de la 1ª (paso a 2 células) (t2), 2ª (paso a 3 células) (t3), 3ª (paso a 4 células) (t4) y 4ª (paso a 5 células) (t5) divisiones embrionarias. También se calcularon los valores de cc2 (t3-t2) y s2 (t4-t3). Asimismo definimos patrones morfológicos relacionados con el

Variable analizada	IC	ES	p-valor	Test estadístico
Nº tratamientos con transferencia	279	77		
Edad media (años)	34.5±3.6	34.2±3.7	0.5	t- student
Nº medio de ovocitos aspirados	11.1	11.7	0.17	Mann-whitney U-test.
Nº transferencias únicas	65 (23%)	20 (26%)	0.65	Fisher
Nº transferencias dobles	197 (71%)	53 (69%)	0.78	Fisher
Nº transferencias triples	17 (6%)	4 (5%)	1	Fisher
Abortos (%)	33 (12%)	11 (14%)	0.56	Fisher
Dosis media FSH (pg/ml)	1777	1713	0.30	Mann-whitney U-test.
Dosis media LH (pg/ml)	161	108	0.19	Mann-whitney U-test.
Media de embriones de alta calidad	3.57	3.9	0.15	t- student

Tabla I. Variables comparadas entre pacientes cuyos embriones fueron cultivados en el ES o en el IC.

desarrollo embrionario tales como;

División directa de cigoto a embrión de 3 blastómeras, definido como $t_3-t_2 < 5$ horas.

Tamaño desigual de las blastómeras en el estadio de 2 células.

Multinucleación en el estadio de 4 células, cuando se distingue más de un núcleo en una o más blastómeras.

RESULTADOS

1. Validación clínica del uso del EmbryoScope como incubador para los ciclos de reproducción asistida

La tabla I muestra las medias, el p-valor y el test estadístico utilizado para las variables analizadas.

No se observaron diferencias significativas para ninguna de las variables estudiadas entre los dos grupos considerados (p-valor > 0.05)

En la tabla II se muestran la comparación de la TGC y TGE para los embriones cultivados en ES y en IC.

No se observan diferencias significativas en los resultados de los ciclos de ICSI realizados en ambos incubadores. Sin embargo, sí que se observa en la siguiente figura (Gráfico 1) que tanto la TGC como la TGE tuvieron valores ligeramente superiores en el ES.

2. Descripción de los tiempos exactos de los principales eventos del desarrollo embrionario mediante el análisis por time-lapse de 1340 embriones humanos

La tabla III incluye el mínimo, máximo y media con el intervalo de confianza para las variables seleccionadas.

3. Determinación de los rangos de tiempo óptimos de eventos clave durante el desarrollo embrionario por medio de cinematografía time-lapse.

De los 885 embriones transferidos, un total de 318 implantaron (35,9%). La tasa de embarazo bioquímico fue 54,2% (n=264) y la tasa de embarazo evolutivo 46,8% (n=228). La tabla IV muestra

Variable analizada	IC	ES	p-valor	Test estadístico
TGC	165 (59%)	49 (64%)	0.51	Fisher
TGE	138 (49%)	42 (55%)	0.44	Fisher

Tabla II. Resultados de los ciclos de ICSI en base a los datos de gestación conocidos.

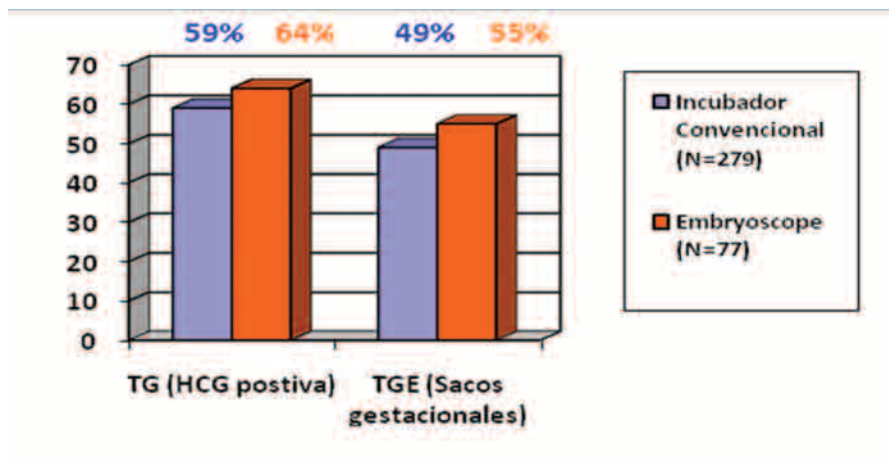


Gráfico 1. Valores de las TGC y TGE obtenidas con ambos incubadores. Se observa una ligera mayor TGC (59% IC vs 64% ES) y de TGE (49% IC vs 55% ES) para el EmbryoScope, aunque esta diferencia no es significativa.

Variable	Media	IC 95%		Mínimo	Máximo
		Límite inferior	Límite superior		
1ª división (a 2 células)	26,10	25,47	26,73	20,40	35,56
2ª división (a 3 células)	36,27	35,35	37,19	24,08	44,45
3ª división (a 4 células)	38,02	37,05	38,99	24,74	48,23
4ª división (a 5 células)	48,95	47,56	50,33	35,64	64,44
5th cleavage (a 6 células)	52,05	50,78	53,32	39,55	66,41
6th cleavage (a 7 células)	54,39	53,01	55,77	39,55	69,75
7th cleavage (a 8 células)	58,41	56,82	60,01	39,55	73,08
Compactación de la mórula	85,61	84,80	86,42	70,22	99,65
Formación del blastocisto	97,68	96,65	98,71	79,94	115,65

Tabla III. Resultados de los análisis realizados sobre las divisiones embrionarias desde el cigoto hasta el embrión de 8 células, la compactación de la mórula y la formación del blastocisto

Evento	t2	t3	t4	t5	cc2	s2
Rango (h) (IN)	24,49-28,3	35,58-40,6	36,65-41,9	49,51-56,7	<11,99	<0,67
Implantados (%)	28,9	29,6	28,1	32,2	28,2	28,2
p	0,008	0,003	0,036	< 0,001	0,032	0,039
N	111	111	111	106	111	111

Tabla IV. Valores obtenidos para las variables analizadas

los valores límites del rango central (IN), el porcentaje de los embriones implantados dentro de este rango así como el p valor de la comparación con los implantados en la categoría OUT (p) y el tamaño muestral (N) para cada evento analizado.

4. Construcción de un modelo multivariable para predecir la implantación basado en el análisis de la morfofocinética por *time-lapse*.

Un total de 201 embriones consiguieron una correcta implantación (saco gestacional), dando lugar a un 38,5% de tasa de implantación. La tasa de embarazo bioquímico fue un 55,1% (n=157) y la tasa de embarazo evolutivo 49,8% (n=142). Un total de 50 embriones presentaron división directa de cigoto a 3 células (t3-t2<5 horas) (n=9) o tamaño desigual de las blastómeras en el estadio de 2 células (n=26) o multinucleación en el estadio de 4 células (n=28). De estos 50 embriones sólo 4 implantaron (8%). Por medio de análisis de regresión logística seleccionamos y organizamos aquellas variables binarias relacionadas con los tiempos exactos para ser usadas junto con los criterios morfológicos de exclusión. El modelo definió t5 OR=3,31 (IC 95% 1,65-6,66) seguido por cc2 OR= 1,84 (IC 95% 0,95-3,58) y s2 OR=2,04 (IC 95% 1,03-4,07) como aquellas variables más relevantes para identificar a los embriones implantados.

Mediante el uso de las variables de exclusión más t5, cc2 y s2 definimos el modelo de regresión logística. El análisis de la curva ROC para determinar las propiedades predictivas de este modelo con respecto a la probabilidad de implantación presentó un valor ROC de 0,720 (IC 95% 0,64-0,80).

Con estos datos definimos un modelo jerárquico con el correspondiente árbol de decisión en el que categorizamos los embriones en 5 categorías de A a E con un símbolo extra positivo (+) o negativo (-).

DISCUSIÓN

Los sistemas de clasificación embrionaria actuales están basados en análisis puntuales realizados normalmente en horario vespertino y que utilizan una valoración morfológica sujeta a cierta subjetividad. Además el análisis morfológico actual implica una "manipulación" embrionaria, entendiéndose como tal la necesidad de sacar el embrión del incubador para su observación en el microscopio de contraste de fases; este procedimiento sin duda alteraría las condiciones de cultivo óptimas para el embrión, con cambios en la temperatura y posiblemente en el pH del medio.

Gracias a los avances tecnológicos actuales, un gran número de técnicas están disponibles y muchas de ellas aplicables al proceso de selección embrionaria y su mejora. Entre ellas destacan las ómicas, en su mayoría centradas en el estudio de los metabolitos secretados o eliminados por el embrión. Dentro de estos avances tecnológicos englobamos la tecnología del *time-lapse* o cinematografía embrionaria. Esta no es una técnica nueva; al contrario, tiene años de existencia aunque recientemente se han dado pasos importantes con la automatización, que han permitido generar casuísticas importantes en un corto periodo de tiempo.

Mediante la cinematografía estamos aprendiendo nuevos conceptos relacionados con la embriología, a la par que descartando o desestimando algunos conceptos que hasta ahora

se asumían como verdades absolutas en embriología. Estamos convencidos de que en los próximos años vamos a re-escribir la embriología clínica y será difícil encontrar un laboratorio donde la tecnología del *time-lapse* en cualquiera de sus presentaciones no esté disponible.

A partir de la aparición del *time-lapse* definimos dos conceptos nuevos, el concepto de cinética y el concepto de dinámica morfológica. En el primero (cinética) englobamos los tiempos en los que se producen los eventos más importantes del desarrollo embrionario, divisiones fundamentalmente. En el segundo (dinámica morfológica) incluimos todos aquellos fenómenos del desarrollo embrionario solo observables o ponderables con la tecnología propuesta, como por ejemplo la división directa a tres células de un embrión.

Los datos generados hasta la fecha nos han permitido por un lado conocer cuáles son los tiempos habituales en los que los fenómenos del desarrollo embrionario más importantes se producen. Por otro lado hemos observado diferencias en los tiempos de las divisiones de los embriones que implantaron y de los que no, es decir presentan un comportamiento diferencial que nos permite utilizar estas variables para seleccionar el mejor embrión. Gracias al desarrollo de este proyecto presentamos un algoritmo de clasificación embrionaria que combina los conceptos de cinética y dinámica morfológica; éste nos permitirá seleccionar el mejor embrión.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASEBIR 2008. Cuadernos de embriología clínica. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. 2º Ed.

- Baczowski T, Kurzawa R, Glabowski W. Methods of embryo scoring in in vitro fertilization. *Reprod Biol.* 2004;4:5-22.
- Bergh C. Single embryo transfer: A mini-review. *Hum Reprod.* 2005;20:323-327.
- Cummins JM, Breen TM, Harrison KL, et al. A formula for scoring human embryo growth rates in in vitro fertilization: Its value in predicting pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1986;3:284-295.
- Dianna Payne, Sean P.Flaherty, Michael F.Barry and Colin D.Matthews Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Human Reproduction* 1997;12:532-541.
- Edwards RG, Fishel SB, Cohen J, et al. Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1984;1:3-23.
- Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP, et al. Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum Reprod.* 2002;17:407-412.
- Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2008;17:385-391.
- Lopes AS, Madsen SE, Ramsing NB, et al. Investigation of respiration of individual bovine embryos produced in vivo and in vitro and correlation with viability following transfer. *Hum Reprod.* 2007;22:558-566.
- Lundin K, Bergh C, Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod.* 2001;16:2652-2657.
- Nagy, Z.P., Liu, J., Joris, H. et al. (1994) Time-course of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.*, 9, 1743-1748.
- Nyboe Andersen A, Gianaroli L, Nygren KG, European IVF-monitoring programme, European Society of Human Reproduction and Embryology. Assisted reproductive technology in Europe, 2000. results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod.* 2004;19:490-503.
- Sakkas D, Percival G, D'Arcy Y, et al. Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection. *Fertil Steril.* 2001;76:1150-1156.
- Sakkas D, Shoukir Y, Chardonnes D, et al. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum Reprod.* 1998;13:182-187.
- Salumets A, Hyden-Granskog C, Suikkari AM, et al. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Hum Reprod.* 2001;16:2177-2181.
- Scott L, Berntsen J, Davies D, et al. Symposium: Innovative techniques in human embryo viability assessment. human oocyte respiration-rate measurement--potential to improve oocyte and embryo selection? *Reprod Biomed Online.* 2008;17:461-469.
- Scott L, Finn A, O'Leary T, et al. Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: Prospective and applied data for increased pregnancy rates. *Hum Reprod.* 2007;22:230-240.
- Scott L. The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. *Hum Reprod Update.* 2003;9:237-249.
- Shoukir Y, Campana A, Farley T, et al. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: A novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod.* 1997;12:1531-1536.
- Van Montfoort AP, Dumoulin JC, Kester AD, et al. Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: A study using single embryo transfers. *Hum Reprod.* 2004;19:2103-2108.
- Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, et al. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod.* 1999;14:2345-2349.

Rapid-i™ Vitrification System

The world's first integrated closed vitrification system.
Your job just got a lot easier.



The Rapid-i™ Vitrification System was successfully launched at ESHRE 2010, and has since then been introduced all over the world. To learn more please contact your local representative.



www.embiol.com

Vitrolife 
Innovative Cell and Tissue Technology

Labo C-Top

Your first choice
for excellent cell cultivation



Top Quality - Made in Germany

**Control of temperature, gas flow and humidity
for optimized conditions**

EMBRIÓLOGOS CLÍNICOS: ¿SOMOS REALMENTE LO QUE QUEREMOS SER?

Antonio Urries

Reproducción Asistida Quirón Zaragoza

e-mail: aurries.zar@quiron.es

Esta ponencia está realizada con el fin único de promover un Debate. Ni el planteamiento ni las conclusiones son en modo alguno oficiales de ninguna sociedad científica, ni colegio profesional, aunque están basadas en aspectos legales y estatutarios extraídos de ellas.

A lo largo de la ponencia se presentarán los resultados de la encuesta enviada a los socios de ASEBIR sobre nuestra situación profesional.

INTRODUCCIÓN

Han pasado ya 23 años desde que apareciera la primera ley española sobre Técnicas de Reproducción Asistida Humana, la Ley 35/1988 de 22 de Noviembre.

Desde entonces muchas han sido las Leyes y Reales Decretos que han ido apareciendo con la intención de normalizar tanto los aspectos legislativos como ejecutivos de nuestra actividad.

De igual modo las *Sociedades Científicas*, pero sobre todo los *Colegios Profesionales* que nos representan a nivel profesional, intentan desde sus competencias normalizar y protocolizar nuestra actividad profesional mediante la emisión de estatutos y acreditaciones varias en un intento de defensa de nuestras atribuciones profesionales, competencias y responsabilidades.

El resultado final es un barullo legislativo, ejecutivo, de competencias y facultades, de distribución de responsabilidades, que nadie tiene claro, empezando por nosotros mismos, frente al que cada cual subsiste como sabe o puede. Y esto, en un campo con un marcado carácter multidisciplinar como es el nuestro, origina que cada uno intente arrimar el ascua a su sardina de una forma más o menos interesada.

Conclusión: ¿sabéis realmente cada uno de vosotros cuales son vuestras competencias? ¿Estáis seguros de no estar cometiendo una dejación de funciones que pudieran tener incluso responsabilidad legal? ¿Tenéis claro de quién es la responsabilidad frente a una infracción dentro de la unidad?

Por ello, el enfoque de esta charla es doble. Por un lado intentar delimitar en qué situación nos encontramos dentro de nuestras unidades (para lo cual espero hayáis contestado a la encuesta que os remitimos) y por otro lado analizar que es lo que podemos esperar de la legislación actual, tanto en positivo como en negativo.

DISCUSIÓN

¿QUÉ SOMOS, RATONES O CONEJOS?

Somos Facultativos y Licenciados Sanitarios. Se nos reconozca o no, estamos ejerciendo de ello.

Un concepto tan simple engloba un significado muy complejo. No en cuanto a la definición del término sino a lo que en sí puede llevar a significar nuestro reconocimiento como Facultativos como veremos más adelante.

Por definición un Facultativo es el que tiene facultad para ejercer una determinada actividad y en la función pública está reconocida administrativamente como aquellos licenciados universitarios que se encuentran en posesión de un título oficial de especialista en Ciencias de la Salud.

Hay facultativos con formación médica pero también facultativos en biología, química, física,... trabajando en el área Sanitaria.

Todos coincidiremos en que, por concepto, nosotros seríamos uno de ellos y nuestros Colegios Profesionales nos avalarían en ello.

El problema reside en que al no tener reconocida nuestra profesión ningún título de especialista, nos encontramos

en una situación de vacío legal, de indeterminación.

Pero ello no significa que debamos renunciar a nuestras competencias. Ningún tribunal podría negarle a un profesional con 20 años de experiencia en reproducción asistida humana, aún sin tener un diploma de cualificación ni especialidad definida, su competencia como facultativo en la materia. Esto incluso tiene su propio término legal. Y si se diera el caso, nuestros Colegios Profesionales deberían ser los que nos defendieran. Es su papel. No nos olvidemos que son entidades públicas, reconocidas, que presentan en exclusiva la representación de la profesión.

¿POR QUÉ QUIERO SER UN FACULTATIVO?

De entrada porque no nos queda otro remedio.

El Real Decreto 1277/2003 de autorización de centros en su ANEXO II Definiciones de centros, unidades asistenciales y establecimientos sanitarios, Oferta asistencial, apartados U27 a U33, delimita claramente la distribución de responsabilidades dentro de cada Unidad Asistencial:

(textual)

U.27 Inseminación artificial: Unidad asistencial que bajo la responsabilidad de un médico especialista en Obstetricia y Ginecología, tiene como finalidad la fecundación humana mediante inseminación artificial...

U.28 Fecundación in vitro: Unidad asistencial que bajo la responsabilidad de un médico especialista en Obstetricia y Ginecología y un facultativo con

formación y experiencia en biología de la reproducción, tiene como finalidad la fecundación mediante transferencia de embriones...

U.29 Banco de semen: Unidad asistencial que, bajo la responsabilidad de un facultativo, tiene como finalidad la obtención, evaluación, conservación y distribución de semen humano para su utilización en las técnicas de reproducción humana asistida...

U.30 Laboratorio de semen para capacitación espermática: Unidad asistencial que, bajo la responsabilidad de un facultativo, lleva a cabo la adecuación de los espermatozoides para su función reproductora.

U.31 Banco de embriones: Unidad asistencial que, bajo la responsabilidad de un facultativo, se encarga de la crioconservación de embriones para transferencia...

U.32 Recuperación de ovocitos: Unidad asistencial que, bajo la responsabilidad de un facultativo, se encarga de la realización de las actividades precisas para la obtención y el tratamiento de gametos...

U.33 Planificación familiar: Unidad asistencial que, bajo la responsabilidad de un médico especialista en Obstetricia y Ginecología es responsable de prestar servicios de atención y asesoramiento relacionados con la reproducción, concepción y contracepción humana.

Si lo analizamos, resulta que sólo otorga responsabilidad única a un *médico especialista en Obstetricia y Ginecología* en la *U.27 Inseminación artificial*. (obvio, ya que correspondería a una consulta de ginecología), aunque esta unidad asistencial se complementaría con la *U.30 Laboratorio de semen para capacitación espermática*, en la que ya no indica la obligatoriedad de que el responsable sea un ginecólogo, sino un *facultativo*. Lo mismo ocurre con la *U.29 Banco de semen* y la *U.31 Banco de embriones*.

Es curioso que en la *U.32 Recuperación de ovocitos* tampoco obligue que la responsabilidad recaiga sobre un ginecólogo, sino sobre un *facultativo*.

Pero la más importante, la *U.28 Fecundación in vitro* indica claramente que es una unidad asistencial de responsabilidad compartida entre un *médico especialista en Obstetricia y Ginecología* y un *facultativo con formación y experiencia en biología de la reproducción*. O sea, nosotros, ya que a mí ya no me cabe duda de que somos claramente *facultativos*, ya que esa es la labor que estamos realizando.

ACORDAROS PARA EL FUTURO: LEY 14/2006 SOBRE TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA.

Y hay otro aspecto de la actual legislación que, bajo mi punto de vista, apoya esta tesis.

La Ley 14/2006, en su Capítulo VIII, artículo 25 indica claramente que de las diferentes infracciones que se puedan realizar será responsable su autor.

Si nosotros realizamos las técnicas de biología de la reproducción en las Unidades asistenciales *U.28*, evaluamos, conservamos y distribuimos el semen humano en las *U.29*, capacitamos el semen en las *U.30*, crioconservamos los embriones en las *U.31* y tratamos los gametos en las *U.32* y, además, la ley nos hace responsables de cualquier infracción que se pueda realizar...estamos ejerciendo de *Facultativos*.

Y pensar...¿Qué pasaría si en estos momentos recibiéramos una inspección de sanidad en nuestras unidades asistenciales y preguntaran dónde está el *Facultativo* con formación y experiencia en biología de la reproducción? No estaría mal que ocurriera. O regularizaban nuestra situación o deberían cerrarnos los centros.

FACULTATIVOS A LA PLANCHA

Realizamos la actividad, somos responsables frente a cualquier infracción,...y muchas veces sin tener el control de cómo realizamos esa actividad de la que somos responsables.

Y allí nuestras propias Sociedades Científicas y Colegios Profesionales

nos han metido, queriendo o sin querer, en un callejón sin salida, indicándonos en sus estatutos atribuciones y obligaciones profesionales en nuestra actividad que muchas veces no venimos realizando de forma habitual, por desconocimiento o simplemente porque "no nos dejan".

Por ejemplo ¿Nunca os habéis preguntado en quien recae la responsabilidad de algo tan simple como indicar si en un ciclo de FIV se realiza ICSI o no? Pues creo que os sorprendería la respuesta emitida al respecto por la asesoría jurídica de ASEBIR/SEF.

¿Sabíais que en los estatutos de la mayoría de los Colegios Profesionales se indica la obligatoriedad de la firma de los trabajos profesionales realizados por parte de los colegiados, responsabilizándose de su contenido y oportunidad, incluso cuando éste sea coautor del mismo junto a otros profesionales de otras titulaciones?

¿Conocíais que la Ley 41/2002 sobre derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica insiste en la obligatoriedad de que cada miembro de un equipo multidisciplinar facilite al paciente la información relativa de la técnica o procedimiento que se vaya a realizar? ¿Informáis vosotros al paciente sobre lo que vais a hacer en vuestra unidad asistencial, de la que sois responsables? ¿Firmáis los informes?

¿Sabíais que como componentes de un equipo biomédico somos corresponsables de la violación del secreto de identidad de los donantes..., de una posible mala práctica en la realización de la T.R.A. o en el tratamiento de los materiales biológicos correspondientes..., en la omisión de información de las técnicas a realizar..., en la posible transmisión a los descendientes de enfermedades congénitas o hereditarias evitables... ?

Así que ojo con pensar que no tenemos ninguna responsabilidad sobre la forma en que se realiza la actividad en nuestra unidad y que sólo debe de interesarnos lo que ocurre de puertas adentro de nuestro laboratorio.

Todos nos atribuyen esas obligaciones y responsabilidades. La legislación actual en todas las leyes y reales decretos vigentes actualmente, el propio ASEBIR en su definición de Competencias dentro del proyecto de Especialidad en Embriología Clínica y los Colegios Profesionales en sus estatutos reguladores del ejercicio profesional, dentro de los derechos y deberes de los colegiados y de los principios básicos reguladores del ejercicio profesional.

Y no nos olvidemos de que ASEBIR es una sociedad científica, privada, pero los Colegios Profesionales son entidades públicas con total competencia a nivel profesional, con capacidad jurídica y sancionadora, que frente a infracciones graves puede imponer sanciones económicas y hasta suspender el ejercicio profesional de un colegiado.

Si no hay problemas todo es perfecto, pero ojo, que frente a cualquier contratiempo podemos acabar a la plancha. Vuelta y vuelta.

YO TAMBIÉN QUIERO PUPITRE...DE DIRECTOR DE UNIDAD

Y si, podemos ser Directores/ Jefes de Servicio de una Unidad de Reproducción Asistida. En la Sanidad Española existen múltiples ejemplos de Jefes de Servicio con titulación de Facultativos en Biología o Bioquímica por poner dos ejemplos. Se encuentran fácilmente en el B.O.E.

Naturalmente son Facultativos...COMO NOSOTROS, pero ya regulados.

Pero no os lo recomiendo si no controláis en su totalidad la actividad que se realice en ella, ya que en ese momento deberéis responder solidariamente de las infracciones cometidas por vuestros equipos biomédicos. ¿Seremos capaces de eso?

CONCLUSIÓN

Podemos seguir con los ojos cerrados pensando que muchas de las cosas que ocurren en nuestras unidades no van con nuestras competencias y responsabilidades o...todo lo contrario. De nada servirá poner en un papel lo que queremos ser si luego

nos pueden decir que nunca lo hemos hecho ni puesto la menor intención en hacerlo.

No pretendo con esta charla indicar a nadie cómo debe de realizar su trabajo, pero si mostraros como las actuales normativas, a pesar de lo que parece, son suficientemente claras sobre lo que podemos y debemos (o deberíamos) hacer.

Por ello, mientras nuestros Colegios Profesionales y Sociedades Científicas intentan conseguir una normativa, legislativa y ejecutiva, bien definida, deberíamos plantearnos cada uno de nosotros, embriólogos clínicos, especialistas en reproducción asistida sin especialidad, facultativos no reconocidos, si en estos momentos somos realmente lo que queremos ser. Y obrar en consecuencia. Estamos en una situación cambiante en la que tenemos muchas perspectivas de mejorar, pero gran parte del cambio se encuentra en lo que hagamos cada uno y no tanto en esperar que nos solucionen otros los problemas.

Posiblemente la encuesta (que espero hayáis contestado) nos dará alguna pista al respecto.

AGRADECIMIENTOS

Jorge Abad. Decano Colegio Oficial de Biólogos de Aragón

Agustín Peraita. Vice Decano Colegio Oficial de Biólogos de Aragón

Mark Grossmann. Facultativo. Licenciado Sanitario. Embriólogo Clínico.

Joan Sarquella. Facultativo. Licenciado Sanitario. Embriólogo Clínico.

Esther Fernández. Facultativa. Licenciada Sanitaria. Embrióloga Clínica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOA Número 35, ORDEN de 26 de febrero de 2008, del Departamento de Política Territorial, Justicia e Interior, por la que se dispone la inscripción en el Registro de Colegios Profesionales de Aragón y de Consejos de Colegios de Aragón de los Estatutos del Colegio Profesional de

Biólogos de Aragón, y su publicación en el "Boletín Oficial de Aragón".

REAL DECRETO 413/1996, de 1 de marzo, por el que se establecen los requisitos técnicos y funcionales precisos para la autorización y homologación de los centros y servicios sanitarios relacionados con las técnicas de reproducción humana asistida.

REAL DECRETO 1277/2003, de 10 de octubre, por el que se establecen las bases generales sobre autorización de centros, servicios y establecimientos sanitarios.

LEY 35/1988, de 22 de noviembre, sobre Técnicas de Reproducción Asistida.

LEY 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica.

LEY 44/2003, de 21 de noviembre, de ordenación de las profesiones sanitarias.

LEY 45/2003, de 21 de noviembre, por la que se modifica la Ley 35/1988, de 22 de noviembre, sobre Técnicas de Reproducción Asistida.

LEY 14/2006, de 26 de Mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida.

REAL DECRETO 42/2010, de 15 de enero, por el que se regula la Comisión de Reproducción Humana Asistida.

APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DEL EMBRYSCOPE PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA CALIDAD OVOCITARIA MEDIANTE EL ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE RESPIRACIÓN

Javier Herrero, Alberto Tejera, María Cruz, Marcos Meseguer
IVI Valencia, Valencia
e-mail: javier.herrero@ivi.es

INTRODUCCIÓN

Con el creciente uso de las técnicas de reproducción asistida, el número de niños concebidos por fecundación *in vitro* (FIV) ha aumentando paulatinamente en todo el mundo y en la actualidad representa entre el 2 y el 4% de los nacimientos anuales, incremento asociado a una elevada tasa de embarazos múltiples (Sakkas and Gardner, 2005).

Los avances en las técnicas de reproducción asistida en los laboratorios, junto con los progresos en nuestro conocimiento sobre la biología del desarrollo embrionario, ha conseguido aumentar las tasas de gestación (Nyboe Andersen et al., 2004). Sin embargo, menos del 5% de todos los ovocitos obtenidos y del 20% de los embriones transferidos se traducen en un embarazo a término, lo que demuestra la discrepancia existente entre el número de ovocitos disponibles, el número de embriones transferidos y el número de bebés nacidos. Esta baja eficiencia evidencia una enorme variabilidad en términos de viabilidad incluso entre ovocitos y embriones de la misma cohorte (Devroey and Van Steirteghem, 2004)

Uno de los principales objetivos de la reproducción asistida desde sus comienzos, especialmente desde el punto de vista del laboratorio de FIV, ha sido el intento de mejorar las tasas de embarazo establecidas. Con este propósito muchas clínicas optan por transferir más de un embrión de acuerdo con la legislación vigente en cada país, con el consiguiente problema del aumento de la tasa de embarazos múltiples (Puissant et al., 1987; Steer et al., 1992; Shulman et al., 1993; Hu et al., 1998; Strandell et al., 2000). En la última década, la reducción en el número de embriones transferidos por ciclo ha conseguido descender el número de este tipo de embarazos, pero aun seguimos arrastrando un elevado porcentaje de gestaciones gemelares

que conlleva altos riesgos para la salud tanto de la madre como de los fetos, incluyendo parto prematuro, bajo peso del recién nacido, mortalidad perinatal y complicaciones obstétricas entre otros (Pinborg, 2005).

El principal motivo por el que ocurre una gestación múltiple en reproducción asistida es la transferencia de más de un embrión. La manera más obvia y sencilla de obtener embarazos únicos es realizar transferencias únicas embrionarias o SET (del inglés, *Single Embryo Transfer*). La dificultad en el establecimiento del SET es que suele traducirse mayoritariamente en un descenso notable en la tasa de embarazo (Bergh, 2005; Nyboe Andersen et al., 2004; Van Royen et al., 1999; Scott et al., 2007) por lo que uno de los objetivos de la FIV debe ser realizar SET de manera rutinaria manteniendo como mínimo las tasas de embarazo alcanzadas cuando transferimos más de un embrión.

Una de las estrategias para realizar SET sin perder posibilidades de gestación por transferencia es el cultivo embrionario hasta estadio de blastocisto, ya que se obtiene más información sobre los embriones y esto se refleja en una mayor implantación (Gadner and Lane, 1997). La principal dificultad es que la capacidad de evolución no es igual en todos los embriones, por lo que la tasa de cancelación, ya sea por bloqueo embrionario, o por la ausencia de blastocistos de calidad suficiente, también puede verse penalizada. Por lo tanto, parece obvio que el hallazgo de marcadores tempranos de calidad embrionaria sería enormemente útil como herramienta de selección, evitando los inconvenientes del cultivo prolongado. Efectivamente, la legislación restrictiva de algunos países, tanto en términos de fecundación como de criopreservación embrionaria, las transferencias únicas de embriones con carácter de obligación en otros y sobre todo la búsqueda de

mejorar las tasas de implantación, ya sea en transferencias únicas o de más de un embrión, están promoviendo el desarrollo de nuevas técnicas para evaluar y seleccionar embriones más eficazmente que mediante el mero criterio morfológico. Algunos de los elementos claves para estos nuevos procedimientos deben ser la no invasividad de la técnica, así como la obtención de información objetiva, cuantificable y rápida.

El método empleado de rutina en los laboratorios de FIV para seleccionar los embriones a transferir es la evaluación de la morfología mediante microscopio óptico invertido. Esta técnica es específica, sensible e inocua y además no conlleva demasiadas complejidades técnicas ni logísticas (Cummins et al., 1986; Scott, 2003; Baczkowski et al., 2004; Lundin et al., 2001; Edwards et al., 1984; Shoukir et al., 1997; Salumets et al., 2001). La clasificación de la calidad embrionaria establecida se basa en observaciones puntuales de características morfológicas durante el desarrollo embrionario. Las limitaciones que se presentan son la evidente subjetividad asociada al criterio del observador y el propio sistema de evaluación, que concibe el desarrollo embrionario desde un enfoque estático y rígido.

A la hora de establecer la calidad embrionaria, el ovocito, con excepción de algunas particularidades muy concretas, suele jugar un papel irrelevante por falta de marcadores morfológicos fiables. Hasta la fecha se han planteado como marcadores la morfología del corpúsculo polar (Ebner et al., 2000), la apariencia, grosor y birrefringencia de la zona pelúcida (Shen et al., 2005; Montag et al., 2006; Montag and van der Ven, 2008) y la posición o forma del huso (Madaschi et al., 2008), pero el valor predictivo de todos ellos aun no está claro y en cualquier caso parece presumiblemente limitado. Algunos dismorfismos ovocitarios también han

sido correlacionados con características concretas citogenéticas, bioquímicas y metabólicas (Van Blerkom, 2000). En contraste con esta carencia de marcadores de calidad ovocitarios, la viabilidad del material de base, los gametos, en particular el gameto femenino, determina el posterior desarrollo de los embriones y el éxito reproductivo del ciclo.

La experimentación animal ha demostrado que las mediciones específicas de varios aspectos de la actividad metabólica de los ovocitos puede predecir el potencial de desarrollo embrionario (Rieger and Loskutoff, 1994; Lane and Gardner, 1996; Houghton et al., 2002). Con este fin, se han estudiado el consumo o liberación de hormonas, factores de crecimiento, aminoácidos (Lane and Gardner, 1996; Leese, 2003), citoquinas y sustratos energéticos como glucosa, piruvato y lactato. Entre las diversas técnicas descritas para cuantificar el metabolismo, la medida del consumo de oxígeno o respiración metabólica se presenta como un buen indicador ya que está directamente relacionado con la producción de ATP vía fosforilación oxidativa durante el desarrollo embrionario. El consumo de O_2 se considera un buen indicador de la actividad metabólica global (Leese, 2003) y un parámetro válido para evaluar la calidad embrionaria (Barnett and Bavister, 1996; Houghton et al., 1996). Está directamente relacionado con la capacidad de un ovocito de producir ATP, un proceso que utiliza el 30% y el 60-70% del oxígeno consumido por el embrión en las primeras divisiones y en el estadio de blastocisto, respectivamente (Trimarchi et al., 2000). Hasta ahora, sabemos que en mamíferos, durante todas las fases del desarrollo, el metabolismo oxidativo es el mayor productor de ATP, haciendo una pequeña contribución la conversión de piruvato o glucosa a lactato (2,6-8,7% del total de la producción) (Sturme y Leese, 2003; Thompson et al., 1996). Se producen dos moles de ATP por cada mol de glucosa convertido a lactato; se generan seis moles de ATP por cada mol de oxígeno consumido. La producción total de ATP no difiere significativamente durante la fase de divisiones, pero se duplica en la fase de blastocisto temprano (Sturme y Leese, 2003). Este incremento en la producción de ATP coincide con el incremento en

requerimientos energéticos como resultado de la recolocación y aumento de actividad de la ATPasa Na^+-K^+ (MacPhee et al., 1994).

Teniendo en cuenta el papel vital de la mitocondria en la competencia ovocitaria y posterior desarrollo, se propuso que medir en ovocitos aislados un aspecto de la función mitocondrial, la respiración (fosforilación oxidativa), puede indicar tanto la carga como la activación mitocondrial y podría ser un procedimiento válido para seleccionar los ovocitos con el mayor potencial de desarrollo.

El consumo de O_2 ha sido previamente medido con técnicas cartesianas, por microespectrofotometría y ultramicrofluorescencia, usando métodos electroquímicos, por escáner automático con electrodos y más recientemente por microscopia de escáner electroquímico (SCEM) (Houghton et al., 1996; Thompson et al., 1996; Trimarchi et al., 2000). Sin embargo, la mayoría de estas técnicas son difíciles, consumen gran cantidad de tiempo y pueden requerir el uso de la iluminación UV, sondas radiactivas o tinciones fluorescentes, lo que los hace inadecuados para la evaluación de la viabilidad embrionaria. A nuestro entender no existen publicaciones de una aplicación de estas tecnologías en humanos en un ensayo clínico para evaluar las posibles correlaciones entre la actividad metabólica y el potencial de implantación de los embriones que han sido transferidos. En la literatura podemos encontrar artículos que muestran resultados sobre esta aplicación en bovino (Lopes et al., 2007; Lopes et al., 2010); sólo el grupo de Scott ha trabajado con ovocitos humanos y fue la primera aproximación en este ámbito, pero el material utilizado fue ovocitos no viables (ovocitos inmaduros o no fecundados) (Scott et al., 2008).

Las mediciones de las tasas de respiración de oxígeno en ovocitos que no tuvieron una fecundación normal y en embriones donados para investigación han mostrado diferencias en las tasas de respiración durante la maduración ovocitaria, fecundación y desarrollo embrionario temprano (Scott et al., 2008). Las tasas de respiración de embriones de la misma cohorte en ciclos que dieron lugar a embarazo fueron

significativamente mayores que las tasas en ciclos que no, y disminuyeron con la edad materna avanzada y los niveles elevados de FSH antes del tratamiento. Desafortunadamente, la tasa de respiración nunca fue determinada a través de ovocitos o embriones que hubieran sido transferidos y nunca se ha establecido si hay alguna correlación entre la tasa de respiración y el éxito reproductivo o si el uso de ciertos protocolos puede influir en el estado metabólico del ovocito. Estudios recientes han mostrado diferencias en la calidad ovocitaria (basado en el análisis de la morfología y el resultado reproductivo) para diferentes regímenes de estimulación ovárica basados en diferentes preparaciones de gonadotropinas, tal como hMG urinaria, menotropina altamente purificada (HP-hMG) y FSH recombinante (rFSH) (Melo et al., 2010). Sin embargo, estos estudios comparan morfología embrionaria y no hay información disponible de marcadores metabólicos de calidad ovocitaria en relación con los protocolos de estimulación ovárica empleados.

En los estudios que se presentan empleamos una combinación de tecnologías; por un lado microsensores de oxígeno para medir su consumo y calcular tasas de respiración, y por otro captura de imágenes mediante time-lapse para caracterizar ovocitos y embriones humanos antes de la fecundación y transferencia, todo ello de forma automatizada. El uso de estos indicadores proporcionaría un método cuantitativo y objetivo de valorar la calidad ovocitaria y embrionaria sustituyendo los métodos de clasificación morfológicos subjetivos por un sistema automatizado que combina morfología, cinética de división y respiración. Por otro lado, la implementación de esta nueva tecnología debería permitir mejorar las tasas de implantación embrionaria gracias a la disminución de la manipulación de los embriones y de la alteración de las condiciones de cultivo *in vitro*.

Nuestro objetivo es evaluar la capacidad de diagnóstico del consumo de oxígeno ovocitario y embrionario como marcador de calidad mediante el uso de la tecnología EmbryoScope, correlacionando las tasas de respiración con parámetros de la estimulación y resultados reproductivos.

MATERIAL Y MÉTODOS

El sistema empleado (EmbryoScope™, Vers.C, Unisense FertiTech, Aarhus, Dinamarca) es un incubador tri-gas con un microscopio y un microsensar de oxígeno incorporados que hace mediciones automáticamente en cada ovocito de manera individualizada.

La sensibilidad y reproducibilidad de la técnica permite tomar medidas precisas de tasas de respiración por debajo de $0,05 \text{ nL hr}^{-1}$ ($=0,6 \times 10^{-15} \text{ mole s}^{-1}$).

El ovocito se coloca en el fondo de un micropocillo (0,5 mm diámetro, 1,5 mm profundidad) en placas especiales (EmbryoSlide™); los pocillos contienen gotas de 25 μL de medio de cultivo y se cubren con una capa de aceite mineral para evitar la evaporación del medio. Mientras el ovocito consume oxígeno, la concentración del mismo en el fondo del pocillo disminuye, estableciendo un gradiente lineal de concentración de O_2 descendente. La tasa de consumo de oxígeno calculada se expresa en fmoles de O_2 consumidos por hora considerando una solubilidad en el medio de O_2 200.4 $\mu\text{mol/L}$ a 37°C y 9% de salinidad.

El aparato mide automáticamente la respiración en cada ovocito en intervalos de tiempo regulares durante la maduración ovocitaria y el desarrollo embrionario. El tiempo entre dos mediciones consecutivas en el mismo ovocito es de aproximadamente 20 minutos.

Las EmbryoSlides son impermeables al intercambio de gases y el microelectrodo para oxígeno se recalibra automáticamente al inicio de cada nuevo ciclo de medición, haciendo mediciones en un medio estéril saturado de oxígeno y una solución anóxica alcalina de ascorbato sódico (pH 13).

En cada experimento se usaron pocillos con medio pero sin ovocitos como controles negativos para corregir las tasas de respiración.

La morfología embrionaria se evaluó en días 2 y 3 basándonos en número, simetría y granulosidad de las blastómeras, tipo y porcentaje de fragmentación, presencia de blastómeras multinucleadas y grado

de compactación (Alikani et al., 2000). Los embriones de buena calidad en día 2 y 3 no deben tener células multinucleadas, deben poseer entre 2 y 5 células en día 2 y entre 6 y 10 en día 3, los fragmentos no deben ocupar más de un 15% del volumen del embrión y sus blastómeras deben tener buena simetría.

RESPIRACIÓN OVOCITARIA

El objetivo de los primeros estudios fue evaluar la influencia de diferentes protocolos de estimulación sobre el consumo de oxígeno de los ovocitos, así como analizar posibles relaciones entre la respiración ovocitaria y morfología ovocitaria, fecundación e implantación embrionaria.

Se incluyeron 395 ovocitos de 56 ciclos de nuestro programa de donación de óvulos entre septiembre de 2009 y enero de 2010. Los 395 ovocitos dieron lugar a 349 ovocitos maduros (metafase II) que fueron microinyectados. Los ciclos fueron seleccionados aleatoriamente para medir la tasa media de respiración de los ovocitos en fmol/seg. Los criterios de exclusión para las receptoras fueron endometriosis, hydrosalpinx, $\text{IMC} > 30$, patologías uterinas (miomas, adenomiosis, endocrinopatías, trombofilia, patologías crónicas, anomalías uterinas congénitas o adquiridas), aborto de repetición, edad por encima de 45 años o factor masculino severo (< 5 millones de células espermáticas móviles en total en el eyaculado).

Las donantes fueron asignadas a uno de los tres regímenes diferentes de estimulación con gonadotropinas; el grupo 1 ($n=14$) 225 UI de rFSH (Gonal-f; Merck Serono, Madrid, Spain); el grupo 2 ($n=28$) 225 UI de HP-hMG (Menopur; Ferring Pharmaceuticals, Madrid, Spain); el grupo 3 ($n=14$) 150 UI de rFSH (Gonal-f; Merck Serono) más 75 UI de HP-hMG (Menopur; Ferring). La ovulación fue inducida mediante la inyección subcutánea de hCG (Ovitrelle, Serono Laboratories, Madrid, Spain). Se midieron los niveles séricos de E_2 y P_4 la mañana de la administración de la hCG.

El consumo de oxígeno fue registrado 3 horas después de la punción, durante una hora, de forma previa a la microinyección. Dado que el sistema hace una medición en cada pocillo cada 20 minutos, en la mayoría de

los ovocitos analizados obtuvimos 3 mediciones independientes.

Entre los 395 embriones estudiados seleccionamos 54 de los transferidos en los que teníamos un resultado de implantación conocida por embrión para realizar análisis detallados, es decir, 100% ($n=12$) donde el número de sacos gestacionales confirmados por ecografía coincide con el número de embriones transferidos; o 0% ($n=42$) donde no se consiguió ni embarazo bioquímico.

RESPIRACIÓN EMBRIONARIA

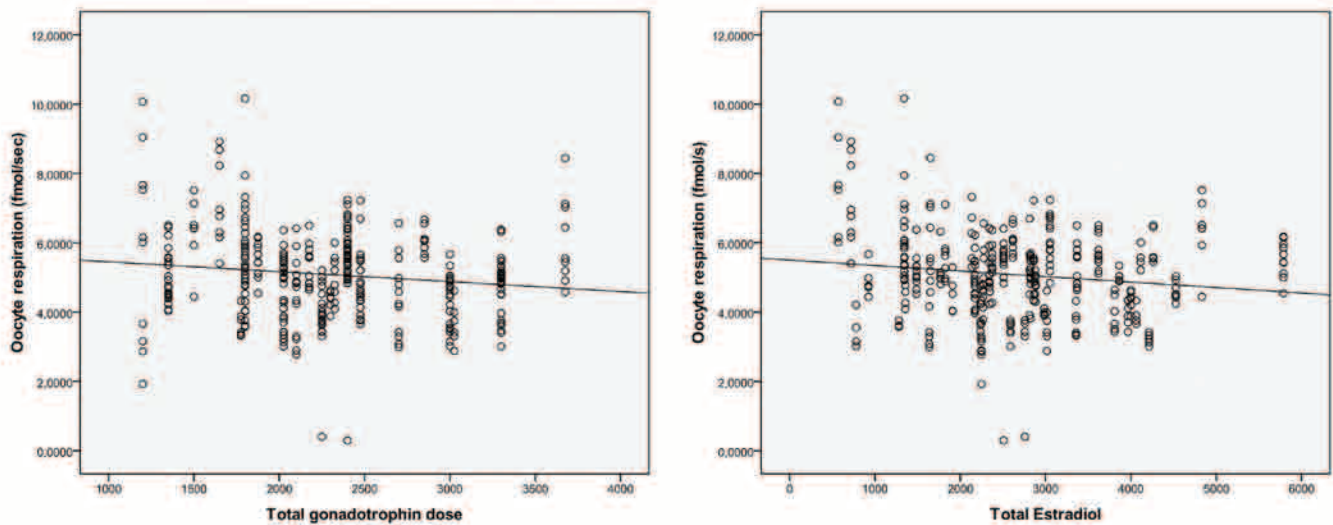
En relación con la respiración embrionaria, hemos intentado correlacionar la tasa media de consumo de oxígeno embrionaria con la implantación y el embarazo evolutivo. En total se realizaron un total de 47741 mediciones en 575 embriones de 56 pacientes receptoras de primer ciclo de ovodonación con transferencia en día 3, permaneciendo en el EmbryoScope durante 72h después del ICSI. Los criterios de exclusión para las receptoras fueron los mismos que en los estudios anteriores. Seleccionamos 57 de los embriones transferidos basándonos de nuevo en el 0% de implantación ($n=48$) o 100% ($n=9$). El número de embarazos obtenidos en el estudio fue 28 (50,0%).

RESULTADOS

La tasa media de consumo de oxígeno para todos los ovocitos en el estudio fue de 5,41 fmol/seg (CI 95% 5.02-5.83).

Como se muestra en la figura 1A, hay una ligera correlación negativa estadísticamente significativa entre el consumo de O_2 de los ovocitos y la dosis total de gonadotropinas administradas en el ciclo ($r = -0.133$, $p = 0.006$). También observamos una correlación negativa entre el consumo de oxígeno y los niveles medidos de E_2 el día de la administración de la hCG (figura 1B, $r = -0.141$, $p = 0.004$).

El estudio usó tres diferentes fuentes de gonadotropinas para los ciclos de las donantes incluidas y encontramos diferencias significativas en la tasa de respiración media ovocitaria entre los grupos con diferentes protocolos de estimulación. Los ovocitos provenientes de ciclos en los que sólo se administró



Figuras 1A y B. Gráfica de dispersión del consumo de oxígeno ovocitario en función de la dosis total de gonadotropinas (A) y el estradiol sérico el día de la hCG (B). La línea trazada representa la tendencia calculada mediante un análisis de regresión lineal.

rFSH (N=86) obtuvieron una mayor tasa de consumo de oxígeno comparado con los ciclos en los que se usó una combinación de HP-hMG y FSH (N=96) o en los que se usó sólo HP-hMG (N=156) (figura 2).

Cuando se compararon las tasas de respiración con la fecundación obtenida en los ovocitos analizados, encontramos diferencias significativas entre los ovocitos que fecundaron correctamente y los que no OR=1,34 (CI95% 1,04-1,73) (p=0,014) (figura 3). El consumo medio de oxígeno fue aproximadamente un 10% mayor para los ovocitos que fecundaron comparado con los que no de la misma cohorte. Coincidiendo con esto, el consumo medio de oxígeno fue significativamente mayor en ovocitos que implantaron comparado con los que no, tal y como se muestra en la figura 4 (p=0,03).

Sin embargo, no encontramos ninguna diferencia significativa en la tasa media de consumo de oxígeno entre ovocitos de buena y mala calidad tanto en día 2 (48h del ICSI) como en día 3 (72h del ICSI), aunque los ovocitos de buena calidad tuvieron un mayor promedio de consumo de oxígeno ambos días (figura 5).

En lo referente a respiración embrionaria encontramos niveles de respiración diferentes en los embriones que implantaron comparado con los que no, 6,21 fmol/sec SD=0,849 vs 5,23 fmol/sec SD=0,345, respectivamente (p< 0,0001). La tasa de respiración también fue mayor en los embriones que consiguieron embarazo evolutivo

comparado con los que no 5,54±1,27 vs 5,10±0,61, respectivamente (p=0,047). Usando el promedio de respiración embrionaria como herramienta de clasificación para determinar la implantación, AUC (área bajo la curva) fue 0,692 (CI 0,556-0,808), este análisis determinó un valor de corte >5,89 mol/seg (Sensibilidad 55,6%, Especificidad 87,5%).

DISCUSIÓN

Los datos mostrados son, bajo nuestro

punto de vista, la primera información acerca de tasas de respiración en ovocitos y embriones humanos viables en clínica dentro del marco de las técnicas de reproducción asistida. Se han presentado usando la misma tecnología otros datos en ovocitos humanos no viables (Scott et al., 2008). Lógicamente ninguno de estos embriones fue transferido y el estudio no puede comparar tasas de respiración y resultados reproductivos. Otro estudio de respiración ovocitaria empleó micro-espectrofotometría con una tecnología

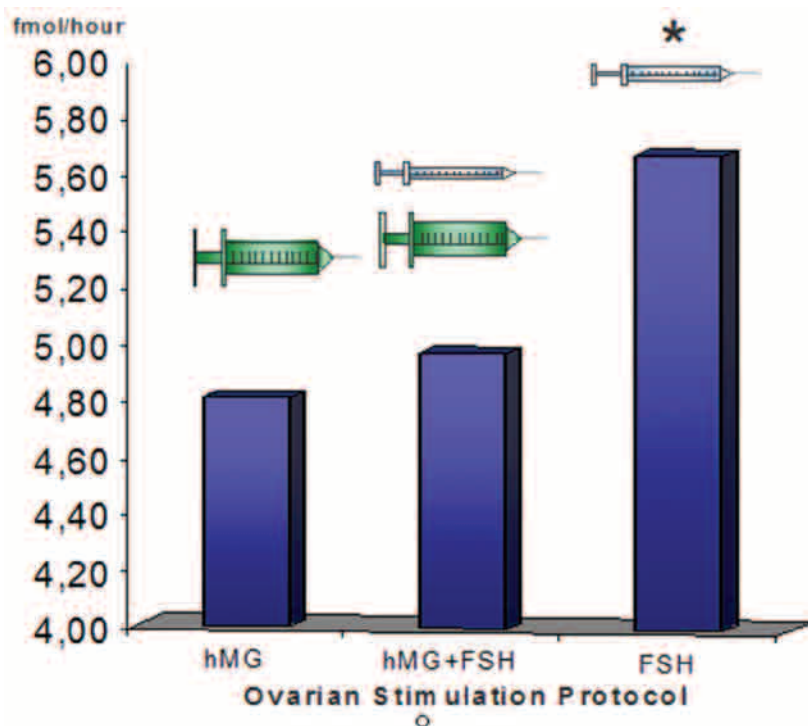


Figura 2. Representación del consumo de oxígeno ovocitario en función del protocolo de estimulación ovárica empleado. El asterisco (*) indica diferencias significativas (p<0.05).

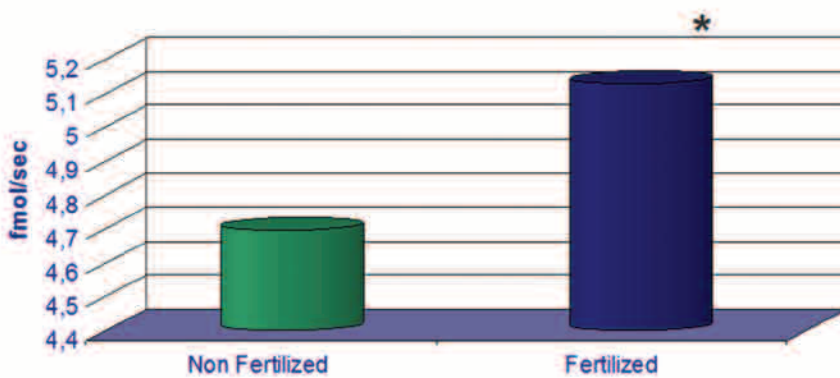


Figura 3. Influencia del consumo de oxígeno ovocitario sobre la fecundación. El consumo de oxígeno se representa en dos grupos según la fecundación de los ovocitos. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

alternativa (Magnusson et al., 1986) pero con el principal inconveniente de la invasividad. Fue llevado a cabo en ovocitos y blastocistos humanos maduros sobrantes de ciclos naturales, sin transferencia ni posibilidad de correlacionarlo con resultados clínicos.

El consumo de oxígeno puede ser relacionado con la carga y actividad mitocondrial presente en el ovocito (Dumollard et al., 2007). El metabolismo mitocondrial es importante para la posterior maduración durante la foliologénesis, desde el estadio de vesícula germinal en el folículo primordial hasta el estadio de metafase

II en el folículo de Graaf (Krisner, 2004). Pero el consumo de oxígeno y la consiguiente carga mitocondrial podría ser importante además en la organización cromosómica así como durante el desarrollo embrionario sirviendo de sustento (Shoubridge and Wai, 2007). En la misma línea de argumentación, si el consumo de oxígeno está relacionado con la actividad mitocondrial, esto está directamente relacionado con la producción de ATP que puede comprometer la fecundación y el desarrollo embrionario (Van Blerkom, 2000). Como el desarrollo embrionario está directamente relacionado con

la salud de los gametos (Meseguer et al., 2010), un potencial marcador de calidad ovocitaria como la respiración podría usarse como indicador de la futura calidad embrionaria.

El régimen de estimulación ovárica empleado parece tener efecto sobre la tasa de respiración ovocitaria. La controversia acerca de la mejor preparación con gonadotropinas para inducir la maduración folicular en FIV, aun continúa (Daya et al., 1995, Agrawal et al., 2000). Diversos estudios han demostrado que el perfil de estimulación en mujeres a las que se les administra HP-hMG difiere del de aquellas con rFSH (Bjercke et al., 2010) y nosotros confirmamos que el consumo de oxígeno se ve afectado también por los diferentes protocolos. Es evidente que el precio de la rFSH tiene un impacto en el presupuesto de las pacientes y en el coste final de las técnicas de reproducción, pero si se asocia a una respiración más activa por parte de los ovocitos comparado con la HP-hMG, su uso podría estar justificado.

Curiosamente, la respiración ovocitaria no se asocia con la morfología embrionaria en día 2 y 3, lo que indica que o bien los parámetros actuales de clasificación de la morfología embrionaria no son lo suficientemente sensibles para detectar en el embrión las diferencias metabólicas que encontramos en el ovocito o bien la división embrionaria en los primeros estadios no es dependiente de la actividad mitocondrial inicial del ovocito.

Por tanto, la respiración se muestra como una herramienta válida y útil para la selección de ovocitos antes de la fecundación, especialmente importante en aquellos países cuyas leyes restrictivas en reproducción asistida sólo permiten microinyectar unos pocos ovocitos. Los resultados obtenidos indican que sería posible construir un perfil ovocitario de respiración que se asocie con una correcta fecundación y posterior implantación. El siguiente paso será demostrar y establecer un umbral de consumo de oxígeno para seleccionar ovocitos con la mayor competencia reproductiva. Para llevar a cabo este objetivo necesitaremos

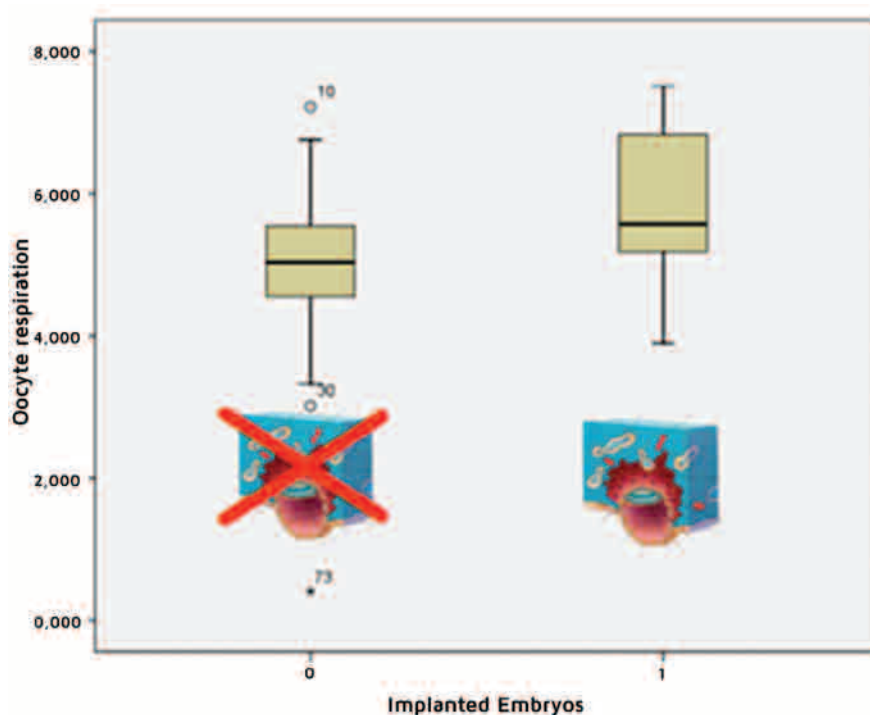


Figura 4. Gráficas de cajas y bigotes de los niveles de consumo de oxígeno en ovocitos que dieron lugar a embriones que implantaron y que no implantaron. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

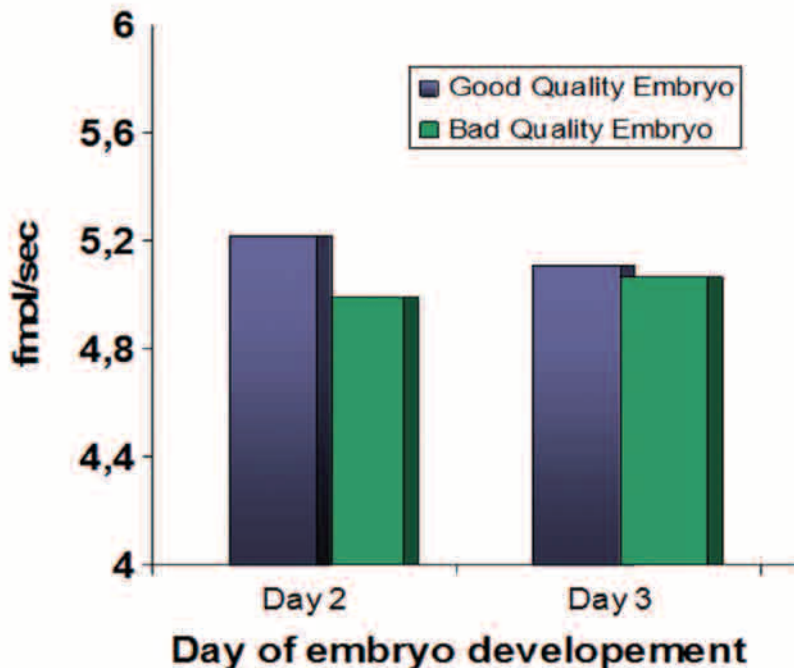


Figura 5. Consumo de oxígeno ovocitario en función de la calidad embrionaria obtenida por los ovocitos 48 horas (día 2) y 72h (día 3) después del ICSI.

realizar estudios prospectivos randomizados.

En lo referente a la respiración embrionaria, también encontramos diferencias en el consumo de oxígeno cuando comparamos embriones en función de su implantación. Los resultados obtenidos indican que, al igual que ocurría con los ovocitos que fecundan correctamente, los embriones que consiguen implantar y dar lugar a un embarazo evolutivo también obtienen mayores tasas de respiración media durante los 3 días de cultivo. Sería interesante analizar el consumo de oxígeno en cada etapa del desarrollo para saber si estas diferencias están más influenciadas por los estadios iniciales del desarrollo o por las etapas más tardías. En este sentido, en la literatura encontramos algunos estudios en animales que han mostrado picos de consumo de oxígeno en el momento de la fecundación (Lopes et al., 2010) y un aumento de dos veces en el consumo durante el estadio de blastocisto comparado con los estadios tempranos (Trimarchi et al., 2000). La caracterización del perfil del consumo de O_2 por etapas del desarrollo podría ser de mayor utilidad aun a la hora de categorizar la calidad de los embriones.

El consumo de oxígeno en ovocitos y embriones se muestra como un buen indicador de la calidad embrionaria. Es evidente que en lo que podríamos denominar potencial implantatorio de un embrión influyen múltiples factores, pero la búsqueda de marcadores fiables, no invasivos, que impliquen una tecnología rápida y sencilla, y sobre todo objetiva, marca claramente el camino a seguir. La combinación de las tasas de respiración con el análisis de la morfocinética embrionaria obtenida mediante *time-lapse*, más objetivo y veraz que la simple evaluación de la morfología convencional, aporta una información única a la hora de seleccionar embriones con el mayor potencial de implantación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baczkowski T, Kurzawa R, Glabowski W. Methods of embryo scoring in in vitro fertilization. *Reprod Biol.* 2004; 4:5-22.

Barnett, D.K. and Bavister, B.D. What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence? *Mol. Reprod. Dev.* 1996; 43:105-133.

Bergh C. Single embryo transfer: A mini-review. *Hum Reprod.* 2005; 20:323-327.

Cummins JM, Breen TM, Harrison KL, et al. A formula for scoring human embryo growth rates in in vitro fertilization: Its value in predicting pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1986; 3:284-295.

Devroey, P. and Van Steirteghem, A. A review of ten years experience of ICSI. *Hum. Reprod. Update* 2004; 10: 19-28.

Dumollard, R., Duchen, M. and Carroll, J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2007; 77: 21-49.

Ebner, T., Yaman, C., Moser, M., Sommergruber, M., Feichtinger, O. and Tews, G. Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 2000; 15: 427-430.

Edwards RG, Fishel SB, Cohen J, Fehilly CB, Purdy JM, Slater JM, et al. Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J.In.Vitro. Fert.Embryo.Transf.* 1984 1(1):3-23.

Gadner, D.K. and Lane, M. Culture and selection of viable blastocyst: a feasible proposition for human IVF? *Hum. Reprod. Update* 1997; 3: 367-382

Houghton, F.D., Thompson, J.G., Kennedy, C.J. and Leese, H.J. Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Mol. Reprod. Dev.* 1996, 44: 476-485.

Houghton, F.D., Hawkhead, J.A., Humpherson, P.G., Hogg, J.E., Balen, A.H., Rutherford, A.J. and Leese, H.J. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum. Reprod.* 2002; 17: 999-1005.

Hu, Y., Maxson, W.S., Hoffman, D.I., Ory, S.J., Eager, S., Dupre, J. and Lu, C. Maximizing pregnancy rates and limiting higher-order multiple conceptions by determining the optimal number of embryos to transfer based on quality. *Fertil. Steril.*, 1998; 69: 650-657.

Krisner, R.L. The effect of oocyte quality on development. *J. Anim. Sci.* 2004; 82 E-Suppl: E14-23.

Lane, M. and Gardner, D.K. Selection of viable mouse blastocysts prior to transfer using a metabolic criterion. *Hum. Reprod.* 1996, 11: 1975-1978.

- Leese, H.J. What does an embryo need? *Hum. Fertil.* 2003, 6: 180-185.
- Lopes, A.S., Greve, T. and Callesen, H. Quantification of embryo quality by respirometry. *Theriogenology* 2007, 67: 21-31.
- Lopes, A.S., Madsen, S.E., Ramsing, N.B., Lovendahl, P., Greve, T. and Callesen, H. Investigation of respiration of individual bovine embryos produced in vivo and in vitro and correlation with viability following transfer. *Hum. Reprod.* 2007; 22: 558-566.
- Lopes, A.S., Lane, M. and Thompson, J.G. Oxygen consumption and ROS production are increased at the time of fertilization and cell cleavage in bovine zygotes. *Hum. Reprod.* 2010; 25: 2762-2773.
- Lundin K, Bergh C, Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod.* 2001; 16:2652-2657.
- MacPhee, D.J., Barr, K.J., De Sousa, P.A., Todd, S.D. and Kidder, G.M. Regulation of Na⁺-K⁺ATPase alpha subunit gene expression during mouse preimplantation development. *Dev. Biol.* 1994, 162: 259-266.
- Madaschi, C., de Souza Bonetti, T.C., de Almeida Ferreira Braga, D.P., Pasqualotto, F.F., Iaconelli, A., Jr and Borges, E., Jr Spindle imaging: a marker for embryo development and implantation. *Fertil. Steril.* 2008, 90: 194-198.
- Magnusson, C., Hillensjo, T., Hamberger, L. and Nilsson, L. Oxygen consumption by human oocytes and blastocysts grown in vitro. *Hum. Reprod.* 1986, 1: 183-184.
- Melo, M., Bellver, J., Garrido, N., Meseguer, M., Pellicer, A. and Remohi, J. A prospective, randomized, controlled trial comparing three different gonadotropin regimens in oocyte donors: ovarian response, in vitro fertilization outcome, and analysis of cost minimization. *Fertil. Steril.* 2010; 94: 958-964.
- Meseguer, M., Santiso, R., Garrido, N., Garcia-Herrero, S., Remohi, J. and Fernandez, J.L. Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertil. Steril.*, 2011; 95: 124-128.
- Montag, M., Schimming, T. and van der Ven, H. Spindle imaging in human oocytes: the impact of the meiotic cell cycle. *Reprod. Biomed. Online* 2006, 12: 442-446.
- Montag, M. and van der Ven, H. Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Oocyte assessment and embryo viability prediction: birefringence imaging. *Reprod. Biomed. Online* 2008, 17: 454-460.
- Nyboe Andersen A, Gianaroli L, Nygren KG, European IVF-monitoring programme, European Society of Human Reproduction and Embryology. Assisted reproductive technology in europe, 2000 results generated from european registers by ESHRE. *Hum Reprod.* 2004; 19:490-503.
- Pinborg A. IVF/ICSI twin pregnancies: risks and prevention. *Hum.Reprod.Update* 2005 11:575-593.
- Puissant, F., Van Rysselberge, M., Barlow, P., Deweze, J. and Leroy, F. Embryo scoring as a prognostic tool in IVF treatment. *Hum. Reprod.* 1987; 2: 705-708.
- Rieger, D. and Loskutoff, N.M. Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 1994; 100: 257-262.
- Shulman, A., Ben-Nun, I., Ghetler, Y., Kaneti, H., Shilon, M. and Beyth, Y. Relationship between embryo morphology and implantation rate after in vitro fertilization treatment in conception cycles. *Fertil. Steril.* 1993; 60: 123-126.
- Sakkas D, Gardner DK. Noninvasive methods to assess embryo quality. *Curr.Opin.Obstet. Gynecol.* 2005; 17(3):283-288.
- Salumets A, Hyden-Granskog C, Suikkari AM, et al. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Hum Reprod.* 2001; 16:2177-2181.
- Scott L. The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. *Hum.Reprod.Update* 2003; 9(3):237-249.
- Scott L, Finn A, O'Leary T, et al. Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: Prospective and applied data for increased pregnancy rates. *Hum Reprod.* 2007; 22:230-240.
- Shen, Y., Betzendahl, I., Sun, F., Tinneberg, H.R. and Eichenlaub-Ritter, U. Non-invasive method to assess genotoxicity of nocodazole interfering with spindle formation in mammalian oocytes. *Reprod. Toxicol.* 2005, 19: 459-471.
- Shoukir Y, Campana A, Farley T, et al. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: A novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod.* 1997; 12:1531-1536.
- Steer, C.V., Mills, C.L., Tan, S.L., Campbell, S. and Edwards, R.G. The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme. *Hum. Reprod.* 1992; 7: 117-119.
- Sturme, R.G. and Leese, H.J. Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. *Reproduction* 2003, 126: 197-204.
- Strandell, A., Bergh, C. and Lundin, K. Selection of patients suitable for one-embryo transfer may reduce the rate of multiple births by half without impairment of overall birth rates. *Hum. Reprod.* 2000; 15: 2520-2525.
- Thompson, J.G., Partridge, R.J., Houghton, F.D., Cox, C.I. and Leese, H.J. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 1996, 106: 299-306.
- Trimarchi, J.R., Liu, L., Porterfield, D.M., Smith, P.J. and Keefe, D.L. Oxidative phosphorylation-dependent and -independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biol. Reprod.* 2000, 62: 1866-1874.
- Van Blerkom, J. Intrafollicular influences on human oocyte developmental competence: perifollicular vascularity, oocyte metabolism and mitochondrial function. *Hum. Reprod.* 2000; 15 Suppl 2: 173-188.
- Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, et al. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod.* 1999; 14:2345-2349.

HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA EN CÉLULA ÚNICA (SC CGH): NUEVA HERRAMIENTA PARA EL SGP

Belén Lledó⁽¹⁾, José Antonio Ortiz⁽¹⁾, Ruth Morales⁽¹⁾, Rafael Bernabeu^(1 y 2).

(1) IB Biotech Alicante. España.

(2) Instituto Bernabeu. Alicante. España.

e-mail: blledo@institutobernabeu.com

INTRODUCCIÓN

El Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP), se utiliza en Medicina Reproductiva con fines asistenciales, siendo al mismo tiempo una de las principales vías de innovación e investigación.

El DGP se ofrece a parejas portadoras o afectas de una determinada enfermedad genética o cromosómica, que se enfrentan a un importante riesgo reproductivo. La selección de embriones histocompatibles para beneficio de un tercero es una reciente aplicación del DGP no exenta de implicaciones éticas.

En el caso de las parejas que se someten a DGP para evitar la transmisión de anomalías cromosómicas, se pueden diferenciar dos grandes grupos: aquellas en las que uno de los miembros de la pareja es portador sano de una alteración estructural en sus cromosomas (Escudero et al., 2008) o parejas que poseen un cariotipo normal pero no consiguen alcanzar gestaciones evolutivas debido a aneuploidías embrionarias (Kuliev y Verlinsky, 2008).

El estudio del DGP de aneuploidías, denominado SGP (*screening* genético preimplantacional), se ha indicado en pacientes con: edad materna avanzada (Platteau et al., 2005), fallos de implantación (Pagidas et al., 2008), factor masculino (Gianaroli et al., 2005) y abortos de repetición (Findikli et al., 2006). En la actualidad, se mantiene una viva controversia sobre su utilidad clínica, en algunas de ellas.

La técnica universalmente utilizada para el SGP es la hibridación *in situ* fluorescente (FISH), que permite el análisis de determinados cromosomas en una única célula biopsiada del embrión a diagnosticar. Existen limitaciones para el empleo de esta técnica en el SGP. Por un lado, la FISH no está diseñada para el análisis de una sola célula, debido a la

eficiencia de hibridación de las sondas, así como se requiere de la fijación de la célula en un portaobjetos con las dificultades que conlleva (Harper y Harton, 2010). Todo ello, conduce a que la capacidad de la FISH de distinguir con precisión embriones euploides es limitada.

Por otro lado, la Hibridación Genómica Comparada (CGH; *Comparative Genomic Hybridization*) permite detectar, en todo el genoma, cambios en el número de copias de las secuencias de ADN (Kallionemi et al., 1993). Mediante la CGH se obtiene una representación de todos los cromosomas pudiendo identificar ganancias o pérdidas en grandes regiones cromosómicas. De modo que, a diferencia de la FISH, no se ve limitada a una parte del genoma. Por tanto, esta técnica sería una herramienta diagnóstica muy útil si se pudiera aplicar a una sola célula porque permitiría obtener el cariotipo molecular de una célula y no únicamente los cromosomas estudiados en la FISH.

Para la CGH en célula única (SC CGH), es imprescindible disponer de suficiente cantidad de DNA, al menos 200 ng, lo que requiere aplicar técnicas de amplificación de todo el genoma, en una única célula (WGA; *Whole Genome Amplification*) (Wells et al., 1999). Una vez resuelta esta limitación inicial, otro aspecto importante desde un punto de vista clínico es el tiempo requerido para obtener los resultados, de al menos 4 días, obligando a criopreservar los embriones tras la biopsia (Wilton, 2005). Como consecuencia, se vería afectada la viabilidad y el potencial implantatorio del embrión, aún teniendo en cuenta las mejoras aportadas por la vitrificación. Además, sigue siendo necesario un segundo ciclo para poder realizar la transferencia y la sincronización útero-embrión.

Para intentar solventar esta importante limitación, se han propuesto diferentes estrategias: incrementar la cantidad de

ADN en la reacción de hibridación o bien optimizar las condiciones de hibridación (Rius et al., 2010).

Con el objetivo de incrementar la cantidad de ADN, diversas técnicas de WGA, DOP-PCR y PEP-PCR se han propuesto como posibles métodos para obtener suficiente cantidad de una sola célula (Peng et al., 2006). Sin embargo, estos métodos poseen una serie de inconvenientes metodológicos. Se ha descrito una nueva técnica de WGA que permite amplificar todo el genoma a temperatura constante, denominada MDA (Multiple Displacement Amplification) (Dean et al., 2002). La reacción de MDA está catalizada por la ADN polimerasa del bacteriofago f29 que posee una elevada procesividad permitiendo obtener una amplificación de 6.5 x10⁶-veces a partir de una sola célula, convirtiéndose en una valiosa herramienta para el DGP (Paez et al., 2004).

La principal aplicación de la MDA en DGP es como paso previo para el diagnóstico de enfermedades monogénicas (Helliani et al., 2004). Desde que se publicó la primera aplicación clínica de la MDA en DGP (Helliani et al., 2005), son numerosas las enfermedades monogénicas: retinosquiasis ligada al cromosoma X (Lledo et al., 2008), síndrome de Marfan (Lledo et al., 2006), adrenoleucodistrofia (Lledo et al., 2007), etc., que pueden ser diagnosticadas mediante el empleo de la MDA como primer paso previo (Lledo et al., 2008).

Nuestro objetivo ha sido evaluar la fiabilidad, sensibilidad y limitaciones de un nuevo protocolo de SC CGH que emplea el MDA como técnica de WGA para poder estudiar la totalidad de cromosomas en una única célula en 48h y así utilizarse esta metodología como alternativa a la FISH en el SGP de embriones.

MATERIALES Y MÉTODOS

- OBTENCIÓN DE LÍNEAS CELULARES EUPLOIDES Y ANEUPLOIDES.

Se emplearon cultivos de células trofoblásticas euploides (46,XY y 46,XX) y aneuploides (47, XYY; 47, XY+15; 47, XY+16; 47, XY+21). Se cultivaron en medios de cultivo adecuados a cada tipo celular. El cultivo celular se empleó para obtener el cariotipo mediante bandas Giemsa, obtener ADN (siguiendo las instrucciones del kit comercial Genomic DNA purification kit, Promega) e individualizar células.

La individualización de las células se realizó empleando técnicas de micromanipulación en un microscopio invertido. Se dispensaron en tubos de PCR de 0,2 ml en los que se llevó a cabo la lisis celular.

- AMPLIFICACIÓN DE TODO EL GENOMA (MDA)

La lisis alcalina se neutralizó para poder realizar la amplificación con la ADN polimerasa del bacteriofago ϕ 29. Una vez equilibrado el pH y disponible la molécula de ADN de la célula, se llevó a cabo la amplificación del ADN con una incubación a temperatura constante (30°C). Se emplearon dos versiones del kit comercial Ilustra Genomiphi® (GE healthcare): HY y V2. Así como diferentes tiempos de incubación de la reacción de la amplificación.

El producto de la amplificación se purificó para eliminar sales o reactivos que puedan interferir en el análisis posterior, empleando el kit comercial GFX PCR purification kit® (GE healthcare). La calidad y cantidad del ADN obtenido se verificó mediante electroforesis de agarosa al 1% en tampón TAE.

- AMPLIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS.

Como resultado de la reacción de MDA se obtuvo ADN suficiente para poder amplificar de la misma célula polimorfismos repartidos por diferentes loci así como poder realizar la hibridación CGH.

Mediante el análisis de polimorfismos (STRs) del ADN amplificado comprobamos la especificidad del ADN amplificado. Los polimorfismos se identificaron empleando un secuenciador ABI PRISM 310.

- REACCIÓN CGH

En primer lugar realizamos el marcaje del ADN amplificado mediante MDA de una sola célula. Se comprobó la consistencia del ADN en un gel 0,8% - 1% de agarosa y se cuantificó mediante espectrofotometría. Empleando la enzima *Nick traslation* (Vysis) marcamos en rojo (fluorocromo Texas Red) el ADN control, que se trató de ADN de una sola célula con cariotipo XY amplificado mediante MDA, y en verde (fluorocromo FITC) marcamos el ADN problema, amplificado de una célula mediante MDA. Se realizaron diferentes ensayos con distintas cantidades de ADN (100, 200 y 400 ng) y tiempos de digestión (1h, 1h y 15', 1h y 30' y 2h).

Una vez marcado el ADN se llevó a cabo la precipitación de las mezclas de ADN rojo-verde conjuntamente, en presencia de Cot-1 ADN (Vysis). La sonda preparada se añadió a portas en los que se había extendido metafases XY normales. Se incubaron a 73°C durante 2 minutos y posteriormente a 37°C durante 36 horas en una cámara húmeda. Tras la hibridación se realizaron los lavados estándar y se observaron al microscopio de fluorescencia empleando DAPI como contraste.

Para la captura de las imágenes empleamos el software Cytovision que captura cada fluorocromo de forma independiente e integra los niveles de fluorescencia. El resultado final lo representa junto al ideograma de cada cromosoma, pudiendo identificar regiones cromosómicas duplicadas/delecionadas mediante una variación en el ratio 0,8 - 1,2.

- VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA EN BLASTÓMERAS

Una vez comprobada y puesta a punto la técnica en células únicas, para poder llevar a cabo la aplicación clínica de la misma, corroboramos su validez en blastómeras procedentes de la biopsia de embriones en cultivo *in vitro*. Para ello, empleamos embriones procedentes de ciclos de SGP que hayan sido diagnosticados como aneuploides mediante la técnica de FISH y que por tanto no son aptos ni para transferir al útero materno ni para criopreservar. Dichos embriones fueron rebiopsiados para confirmar mediante FISH el diagnóstico y sometidos a SC CGH para validar la técnica. Se analizaron las

blastómeras procedentes de 20 embriones aneuploides de 3 ciclos de SGP por abortos de repetición empleando el protocolo de SC CGH previamente optimizado.

RESULTADOS

Los principales factores limitantes de la SC-CGH son el tiempo en llevar a cabo la técnica y la cantidad de ADN. Se emplearon dos kits comerciales para llevar a cabo la WGA con el objetivo de seleccionar aquel que proporcionara mayor cantidad de ADN en el menor tiempo de amplificación. La versión HY permite obtener cantidades de hasta 50 μ g, mientras que el rendimiento de la V2 es de 4 μ g. Por otro lado, los tiempos de reacción son de toda la noche o 2-3h respectivamente. Se realizaron combinaciones para los diferentes kits y condiciones. El kit HY con una incubación de toda la noche proporcionó una mayor cantidad de ADN a partir de una sola célula, sin embargo se obtuvo una mayor proporción de productos inespecíficos. Este inconveniente junto con el hecho del tiempo tan extenso de reacción descartó esta versión para realizar la MDA.

Por otro lado, con el kit V2 se obtuvieron hasta 10 μ g de ADN empleando una incubación de toda la noche y una media de 2,5 μ g en 3h de reacción por célula individualizada, así como una mayor especificidad (estudio de polimorfismos) en estas últimas condiciones. Considerando la limitación de tiempo y que la cantidad de 2,5 μ g es más que suficiente para realizar la CGH así como los análisis de polimorfismos se eligió como método de WGA para la SC-CGH una reacción de 3h empleando la versión V2.

El ADN obtenido de la reacción de MDA se validó mediante la amplificación de polimorfismos de diferentes loci. De este modo comprobamos que en la amplificación se encuentra representado todo el genoma, así como identificamos la presencia de productos inespecíficos (Tabla I).

La reacción de CGH consiste en la cohibridación en presencia de Cot-1 (ADN humano placentario altamente repetitivo) del ADN problema y control marcado con diferentes fluorocromos. Este marcaje se realiza empleando una enzima (DNA pol I) que incorpora a la cadena de ADN nucleótidos marcados con los fluorocromos, simultáneamente

se digiere la molécula de ADN por acción de la ADNasa I. El tiempo de digestión debe ser optimizado para asegurar un tamaño de sondas adecuado que compense una hibridación homogénea y el menor ruido de fondo posible. El tamaño de digestión debe estar entre 300-3000pb para ADN genómico y entre 100 y 300 para construcciones BACs. El tamaño ideal resultó ser 500-1000pb y sin fragmentos por debajo de 100 pb. Un tiempo de digestión de 1h permitió obtener sondas de las características anteriormente descritas.

Como se ha mencionado, otro factor limitante para la reacción de CGH es la cantidad de ADN. Se probaron varias combinaciones para cada ADN (problema y control) y tiempos de digestión. Como resultado se obtuvo que la cantidad adecuada de ADN problema y control es de 400ng y el tiempo de digestión de 1h.

Mediante el software Cytovision realizamos la captura de cada fluorocromo y la integración de los niveles de fluorescencia. El resultado final quedó representado junto al ideograma. Al menos 15 metafases fueron capturadas e integradas en el análisis. Se consiguió identificar la aneuploidía correspondiente a cada tipo celular empleado en el estudio a partir de una sola célula (Figura1).

A partir de las blastómeras procedentes de embriones desechados de ciclos de SGP empleando el kit de MDA V2 y 3h de reacción se obtuvo una media de ADN amplificado de 64 ng/μL. Empleando el protocolo de SC CGH optimizado se obtuvo resultado en el 85% de las blastómeras analizadas. En el resto de los casos la baja concentración de ADN obtenida (<20 ng/μL) podría explicar el fallo en la reacción SC CGH. Considerando la concordancia entre los resultados de FISH y SC CGH: el 42% de los resultados de SC CGH tuvieron una concordancia completa, el 52% tuvieron una concordancia parcial, es decir, mostraron además de las aneuploidías detectadas por FISH otras que no se pudieron detectar mediante FISH y solo en un caso (6%) se observó una discordancia (Tabla II). Teniendo en cuenta estos resultados el 94% de los resultados de SC CGH serían total o parcialmente concordantes y por tanto quedaría validada su utilidad clínica. El cromosoma más frecuentemente implicado en aneuploidias fue el 16, seguido por el

	L1	L2	L3	L4	Eficiencia de amplificación	ADO
X-22	223 - 207	223 - 207	223 - 207	223 - 207	12/12	NO
HD	165 - 226	165 - 226	165 - 226	165	12/12	SI
X Fragile	248 - 234	248 - 234	248 - 234	248 - 234	12/12	NO
DMPK	112 - 118	112 - 118	112 - 118	112 - 118	12/12	NO
SCA3	223 - 229	223 - 229	223 - 229	223 - 229	12/12	NO
mts-2	132 - 149	132 - 149	132 - 149	132	12/12	SI
mts-4	117 - 121	117 - 121	117 - 121	117 - 121	12/12	NO
G6P	189 - 186	189 - 186	189 - 186	189 - 186	12/12	NO
DXS1073	126 - 124	126 - 124	126 - 124	126 - 124	12/12	NO
DXS9901	136 - 141	141	136 - 141	136 - 141	12/12	SI
D19S219	164 - 146	164 - 146	164 - 146	146	12/12	SI
D19S559	186 - 196	186 - 196	186 - 196	186 - 196	12/12	NO
D11S129	157 - 155	157 - 155	157 - 155	157 - 155	12/12	NO
D11S4132	189	198 - 186	198 - 186	198 - 186	12/12	SI
CA6	168 - 174	168 - 174	168 - 174	168 - 174	12/12	NO
TAA2	211 - 207	211 - 207	211 - 207	211 - 207	12/12	NO
D15S1028	176 - 190	176 - 190	176 - 190	176 - 190	12/12	NO
D15S1024	248 - 254	248 - 254	248 - 254	248	12/12	SI
STR50	238 - 230	238 - 230	238 - 230	238 - 230	12/12	NO
3'CA	126 - 130	126 - 130	126 - 130	126 - 130	12/12	NO
5'CA	96 - 92	96 - 92	96 - 92	96 - 92	12/12	NO
D17S789	161 - 152	161 - 152	161 - 152	161 - 152	12/12	NO
D17S821	156 - 149	156 - 149	156 - 149	156 - 149	12/12	NO
D11S1344	279 - 273	279	279 - 273	279 - 273	12/12	SI
D11S1983	220 - 228	220	220 - 228	220	12/12	SI

Tabla I. Resultado de los análisis de polimorfismos.

13, 15, 18 y los cromosomas sexuales con la misma importancia entre ellos.

DISCUSIÓN

Una de las principales limitaciones de las técnicas de reproducción asistida es la tasa de implantación. Seleccionando los embriones con mejor capacidad implantatoria conseguiremos incrementar las tasas de éxito y disminuir los embarazos múltiples. En la actualidad el método universalmente empleado es la selección morfológica. Sin embargo, hay parejas en las que aún transfiriendo embriones morfológicamente de buena calidad no se consiguen gestaciones evolutivas, pudiendo ser debido a aneuploidías embrionarias. En estas parejas, el objetivo es identificar los embriones con mayor capacidad implantatoria mediante SGP. El SGP empleando la técnica de FISH permite el análisis de determinados cromosomas en una única célula biopsiada del embrión a estudiar.

Sin embargo, el SGP se encuentra en torno a un debate abierto por parte de la comunidad científica desde diferentes perspectivas. Desde un punto de vista clínico se requieren estudios randomizados con suficiente potencia para demostrar su efecto beneficioso en ciertos tipos de pacientes (Harper et al., 2010). En cuanto a la propia biología del embrión en división existen en la actualidad dos aspectos que pueden afectar al éxito del SGP como son el mosaicismo y la capacidad de autocorrección. El mosaicismo afecta al 14% de los embriones (Bielanska et al., 2005) y únicamente se podría identificar mediante la biopsia y análisis de dos células. A pesar de que la propia capacidad de autocorrección del embrión podría revertir aneuploidías, en la bibliografía únicamente se han descrito un 9% de embriones en los que tras ser diagnosticados en D+3 como aneuploides se identifican en D+5 líneas euploides (Barbash-Hazan et al., 2009).



Figura 1. Resultado de SC CGH de una sola célula aneuploide.

Estos embriones serían mosaicos y en ningún caso transferibles por tanto la posible capacidad de autocorrección no afectaría al éxito del SGP. Finalmente, desde una perspectiva de la técnica de análisis genético empleada, la FISH en SGP únicamente proporciona información del número de cromosomas analizados mediante sondas centroméricas o locus específicos, de modo que solo se tiene información de esta región sin hacer referencia al resto del cromosoma. Esta información no se corresponde con la dotación cromosómica completa de la célula y por lo tanto algunos embriones aneuploides son diagnosticados erróneamente como normales ya que tienen aneuploidías para otros cromosomas que no están incluidos en el test. Por todo ello, se han desarrollado numerosos intentos por alcanzar la información de la dotación completa como por ejemplo técnicas de obtención de metafases (Shkumatov et al., 2007).

La hibridación genómica comparada (CGH) es una técnica de citogenética molecular desarrollada para el análisis de ganancias y pérdidas de ADN. Está basada en el análisis de ADN genómico, de modo que no requiere cromosomas en metafase y por tanto tampoco cultivos celulares. Esta técnica sería idónea para el SGP si se pudiera aplicar a una única célula, lo que requiere la amplificación de ADN a partir de dicha célula para obtener suficiente cantidad para el estudio. La principal desventaja de esta técnica es el tiempo de hibridación para obtener el diagnóstico de los embriones, ya que éste supera el tiempo máximo de cultivo *in Vitro* del embrión. De modo que, para utilizar la SC CGH en blastómeros procedentes de embriones en D+3 es imprescindible la criopreservación de los mismos (Voullaire et al., 2000). Otra alternativa consistiría en emplear el corpúsculo polar, sin embargo las aneuploidías post-zigóticas o de origen paterno quedarían

sin diagnosticar. Los esfuerzos actuales están dirigidos a disminuir el tiempo de hibridación o bien emplear técnicas alternativas como el *array*-CGH (Harper y Harton, 2010).

Otra indicación para la SC CGH son las parejas portadoras de alteraciones cromosómicas estructurales. El DGP mediante la técnica de FISH permite seleccionar los embriones que carecen de desequilibrios, sin embargo es incapaz de identificar el efecto intercromosómico (Gianaroli et al., 2002). Por ello, la puesta a punto de la SC CGH permitirá no sólo identificar aquellos embriones balanceados para la alteración cromosómica que porta esa pareja sino también la dotación para el resto de cromosomas del cariotipo, aportando un diagnóstico de certeza e incrementando las tasas de implantación y embarazo y las posibilidades de lograr un embarazo evolutivo a término.

PACIENTE	EMBRIÓN	ADN obtenido (ng/μl)	RESULTADO FISH	RESULTADO SC CGH	CONCORDANCIA (T: TOTAL, P: PARCIAL, D: DISCORDANCIA)
1	2	20	XY+18	XY+18+14	P
	5	52	XY-15	XY-15	T
	6	17	XX-21	--	SIN RESULTADO
	7	20	XXYY-21	XY	D
	9	10	XY-13	--	SIN RESULTADO
	13	32	XY-16	XY-16-8	P
	14	16	XY-13-15	--	SIN RESULTADO
	16	20	XX+16	XX+16	T
	20	86	XX+21	XX+21	T
2	2	42	X0	X0+11	P
	3	112	XX-13-16-18-22	XX+7-9-13-16-18-22	P
	4	107	XY+13+15	XY+13+15	T
	8	104	XY+15-16	XY+15-16-20	P
	10	772	XX+21	XX+21	T
	12	53	X0-16	X0+5-16	P
3	3	27	XX-13	XX-13	T
	4	34	XY-22	XY-22	T
	9	62	XY-18	XY-12-18	P
	12	108	X0	X0	T
	14	107	XX-16	XX-16-18	P

Tabla II. Resultado de la comparación entre los resultados de FISH y SC CGH.

Finalmente, existe una nueva línea para el SGP que se está desarrollando en los últimos años e intenta salvar los principales inconvenientes del SGP como es la biopsia de trofoectodermo. Numerosos estudios evidencian una mejoría en los resultados del SGP tras el empleo de la CGH o array-CGH sobre células del trofoectodermo (Sher et al., 2009; Schoolcraft et al., 2010).

Hemos conseguido desarrollar un protocolo que permite obtener el cariotipo molecular de una sola célula en un tiempo máximo de 48h. Empleando la técnica de MDA hemos obtenido suficiente cantidad de ADN para llevar a cabo la hibridación en 36h permitiendo identificar la aneuploidía propia de cada célula, así como un análisis de polimorfismos evidenciando conjuntamente una representación homogénea del genoma.

La validación de este protocolo en blastómeras permite su posterior aplicación clínica consiguiendo transferir embriones euploides, completamente estudiados, seleccionando con criterios más estrictos y fiables los embriones cromosómicamente sanos, disminuir

las tasas de aborto, evitando la criopreservación de los embriones estudiados, eximiéndoles del proceso de congelación-descongelación y con todo ello, optimizar los resultados clínicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barbash-Hazan S, Frumkin T, Malcov M, Yaron Y, Cohen T, Azem F, Amit A, Ben-Yosef D. (2009). Preimplantation aneuploid embryos undergo self-correction in correlation with their developmental potential. *Fertil Steril.* 92:890-6.

Bielanska M, Jin S, Bernier M, Tan SL, Ao A. (2005). Diploid-aneuploid mosaicism in human embryos cultured to the blastocyst stage. *Fertil Steril.*; 84:336-42.

Dean FB, Hosono S, Fang L, Wu X, Faruqi AF, Bray-Ward P, Sun Z, Zong Q, Du Y, Du J, Driscoll M, Song W, Kingsmore SF, Egholm M, Lasken RS. (2002) Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci.* 99, 5261-6.

Escudero T, Estop A, Fischer J, Munne S. (2008) Preimplantation genetic diagnosis for complex chromosome rearrangements. *Am J Med Genet A.* 13, 1662-9.

Findikli N, Kahraman S, Saglam Y, Beyazyurek C, Sertyel S, Karlikaya G, Karagozoglu H, Aygun B. (2006) Embryo aneuploidy screening for repeated implantation failure and unexplained recurrent miscarriage *Reprod Biomed Online.* 13, 38-46.

Gianaroli L, Magli MC, Cavallini G, Crippa A, Nadalini M, Bernardini L, Menchini Fabris GF, Voliani S, Ferraretti AP. (2005). Frequency of aneuploidy in sperm from patients with extremely severe male factor infertility. *Hum Reprod.* 20:2140-52.

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munné S, Balicchia B, Escudero T, Crippa A. (2002). Possible interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers. *Hum Reprod.* 17:3201-7.

Harper J, Coonen E, De Rycke M, Fiorentino F, Geraedts J, Goossens V, Harton G, Moutou C, Pehlivan Budak T, Renwick P, Sengupta S, Traeger-Synodinos J, Vesela K. (2010). What next for preimplantation genetic screening (PGS)? A position statement from the ESHRE PGD Consortium steering committee. *Hum Reprod.* 25:821-3.

Harper JC, Harton G. (2010). The use of arrays in preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertil Steril.* 94:1173-7.

Hellani A, Coskun S, Tbakhi A, Al-Hassan S. (2004). Clinical application of multiple displacement amplification in preimplantation genetic diagnosis. *Reprod Biomed Online.* 10:376-80.

Hellani A, Coskun S, Benkhalifa M, Tbakhi A, Sakati N, Al-Odaib A, Ozand P. (2004) Multiple displacement amplification on single cell and possible PGD applications. *Mol Hum Reprod.* 10:847-52.

Kallionemi, OP, Kallionemi A, Sudar, D, et al. (1993). Comparative Genomic hybridisation: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumours. *Cancer Biol.* 4, 41-46.

Kuliev A, y Verlinsky Y. (2008). Preimplantation genetic diagnosis: technological advances to improve accuracy and range of applications. *Reprod Biomed Online.* 16, 532-8.

Lledó B, Ten J, Rodríguez-Arnedo D, Llácer J, Bernabeu R. (2008). Preimplantation genetic diagnosis of X-linked retinoschisis. *Reprod Biomed Online.* 16, 886-92.

Lledó B, Bernabeu R, Ten J, Galán FM, Cioffi L. (2007). Preimplantation genetic diagnosis of X-linked adrenoleukodystrophy with gender determination using multiple displacement amplification. *Fertil Steril*. 88:1327-33.

Lledó B, Ten J, Galán FM, Bernabeu R. (2006). Preimplantation genetic diagnosis of Marfan syndrome using multiple displacement amplification. *Fertil Steril*. 86: 949-55.

Paez JG, Lin M, Beroukhir R, Lee JC, Zhao X, Richter DJ, et al. (2004) Genome coverage and sequence fidelity of phi29 polymerase-based multiple strand displacement whole genome amplification. *Nucleic Acids Res*. 32, e71

Pagidas K, Ying Y, Keefe D. (2008) Predictive value of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in repeated IVF-ET cycles among women with recurrent implantation failure. *J Assist Reprod Genet*. 25, 103-6.

Platteau P, Staessen C, Michiels A, Van Steirteghem A, Liebaers I, Devroey P. (2005).

Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in women older than 37 years. *Fertil Steril*. 84, 319-24.

Rius M, Obradors A, Daina G, Cuzzi J, Marquès L, Calderón G, Velilla E, Martínez-Passarell O, Oliver-Bonet M, Benet J, Navarro J. (2010) Reliability of short comparative genomic hybridization in fibroblasts and blastomeres for a comprehensive aneuploidy screening: first clinical application. *Hum Reprod*. 25:1824-35.

Sher G, Keskinetepe L, Keskinetepe M, Maassarani G, Tortoriello D, Brody S. (2009). Genetic analysis of human embryos by metaphase comparative genomic hybridization (mCGH) improves efficiency of IVF by increasing embryo implantation rate and reducing multiple pregnancies and spontaneous miscarriages. *Fertil Steril*. 92:1886-94.

Shkumatov A, Kuznyetsov V, Cieslak J, Ilkevitch Y, Verlinsky Y. (2007) Obtaining metaphase spreads from single blastomeres

for PGD of chromosomal rearrangements. *Reprod Biomed Online*. 14:4 98-503.

Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, Munne S, Katz-Jaffe MG, Wells D. (2010). Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage *Fertil Steril*. 94:1700-6.

Voullaire L, Slater H, Williamson R, Wilton L. (2000) Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Hum Genet*. 106:210-7.

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

Wilton L. (2005) Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genomic hybridization. *Hum Reprod Update*. 11, 33-41.



REPROGENETICS

COMPROMETIDOS
CON LA
INNOVACIÓN
EN DGP

DIRECTORES CIENTÍFICOS

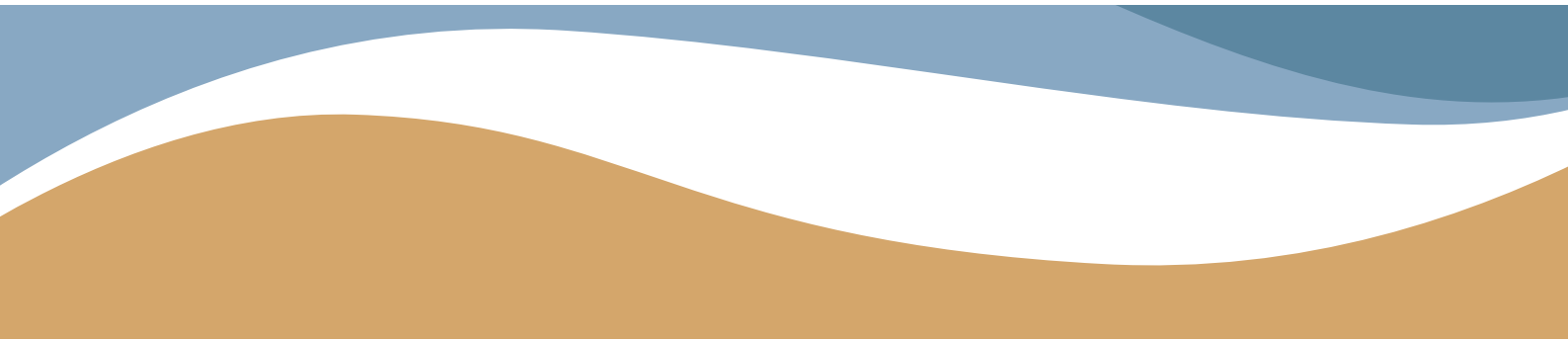
Mireia Sandalinas - Carles Giménez

ANÁLISIS DE TODOS LOS CROMOSOMAS MEDIANTE ARRAY CGH (aCGH24)

REPROGENETICS SPAIN

pgdteam@reprogenetics.es

+34 93 241 77 24





COMUNICACIONES ORALES

001: APLICACIÓN DE LAS REDES NEURONALES AL ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LOS FACTORES AMBIENTALES EN LA CALIDAD SEMINAL

JL Girela¹, D Gil², MJ Gómez-Torres¹, M Johnsson³, J De Juan¹

¹Departamento de Biotecnología, Universidad de Alicante, España. ²Departamento de Tecnología informática y computación, Universidad de Alicante, España. ³Departamento de Ciencias Cognitivas, Universidad de Lund, Suecia.
e-mail: girela@ua.es

INTRODUCCIÓN

Al analizar los índices de demanda de los tratamientos de reproducción asistida, se observa que cada vez son más frecuentes las consultas por problemas reproductivos en los que el factor masculino está alterado. Durante las últimas décadas se mantiene abierto un debate ante la posibilidad de un declive en la calidad seminal. En cuanto a las causas de este posible descenso de la calidad seminal que afecta a la fertilidad masculina, se han barajado diferentes factores, desde un aumento en la incidencia de patologías del aparato reproductor masculino, pasando por factores ambientales y ocupacionales, hasta determinados hábitos de vida. El análisis de semen es la piedra angular del estudio del varón; pese a que por sí solo no es capaz de determinar si un varón puede tener descendencia, es un buen predictor del potencial fértil del varón.

OBJETIVO

En este trabajo se pretende profundizar en los problemas de fertilidad masculina desde la perspectiva de la posible influencia de los factores ambientales y los hábitos de vida en la calidad del semen. También responde a la necesidad de desarrollar una metodología que permita un diagnóstico más eficaz del potencial fértil del varón, evitando el tratamiento innecesario o diagnósticos erróneos. Para ello utilizamos técnicas de inteligencia artificial para producir un Sistema de Ayuda a la decisión o Decision Support Systems (DSS).

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización del estudio se contó con la participación de 123 voluntarios de entre 18 y 36 años, sin problemas reproductivos conocidos.

Tras ser debidamente informados se les solicitó una muestra seminal tras un periodo de abstinencia de entre 3 y 6 días, realizándose un seminograma a cada una de las muestras recibidas. El día del análisis, se solicitó también a los voluntarios que rellenaran un cuestionario sobre hábitos de vida y su estado de salud.

Se han utilizado redes neuronales artificiales para determinar la capacidad de los datos del cuestionario para predecir los parámetros seminales del individuo. Para ello se ha desarrollado una red neuronal artificial del tipo Multi-Layer Perceptron (MLP), que consiste en tres capas de neuronas: la capa de entrada que recibe los datos externos, una capa oculta, y una capa de salida que genera la clasificación de los resultados. En el caso del presente estudio, la capa 1 está formada por cada una de las variables del cuestionario analizadas. La capa oculta es la más importante en la realización del MLP, y supone un balance entre el rendimiento y el riesgo de sobreajuste. De esta forma la red será capaz de generalizar ante nuevos casos en lugar de únicamente repetir los registros conocidos. En este estudio se estimó que el número de neuronas más adecuado era de 21. La capa de salida estaba formada por dos categorías correspondientes a la clasificación de los parámetros seminales como normales o alterados.

RESULTADOS

Tras someter los datos a varias pruebas de validación y de aprendizaje por parte de la red neuronal, se obtuvieron los siguientes resultados. El sistema clasificó correctamente el 87% de las muestras, mostrando una sensibilidad del 90,32%, una especificidad del 81,58%, y unos valores de predicción

positiva del 88,89% y de predicción negativa del 83,78%.

CONCLUSIONES

La MLP desarrollada en el presente estudio muestra un gran nivel de precisión en base a los diferentes parámetros medidos, pudiendo destacar dos conclusiones principales: por una parte, el uso de las técnicas de inteligencia artificial puede resultar muy interesante en la toma de decisiones sobre el diagnóstico de los parámetros seminales, y por otra que supone una ayuda fundamental en el futuro estudio de la influencia de los factores ambientales en los parámetros seminales.

002: EFECTO DEL POLIMORFISMO (TA)_N DEL PROMOTOR DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ALFA (ERA) SOBRE EL RECUENTO ESPERMÁTICO.

J. A. Ortiz¹, B. Lledó¹, R. Morales¹, J. Llácer² y R. Bernabeu^{1,3}.

¹Instituto Bernabeu Biotech, ²Instituto Bernabeu Elche, ³Instituto Bernabeu Alicante

e-mail: blledo@institutobernabeu.com

INTRODUCCIÓN

La infertilidad masculina es un proceso que involucra múltiples componentes y en el que la genética participa de forma notable.

Los estrógenos desempeñan un papel importante en la diferenciación, maduración, y función del sistema reproductor humano, sobre todo en el femenino, pero en la actualidad ya está claramente aceptada y establecida la función que desempeñan los estrógenos durante la espermatogénesis.

La acción de los estrógenos es mediada principalmente por dos isotipos del receptor de estrógenos (ER): α y β . Ambos isotipos son codificados por dos genes diferentes.

Se han descrito en la literatura diferentes mutaciones y polimorfismos en ambos receptores, pero en algunos casos se ignora su posible influencia sobre la calidad seminal.

OBJETIVOS

Determinar la posible asociación entre el recuento espermático y el polimorfismo (TA)_N del promotor de ER α .

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo en el que se determina el número de repeticiones TA en el promotor del gen ER α en dos grupos de estudio:

Control: Normozoospermicos (n=50)

Pacientes: Oligozoospermicos o criptozoospermicos (n=150).

Las muestras seminales son obtenidas mediante masturbación (3-5 días de abstinencia). El análisis seminal se lleva a cabo de acuerdo a las guías de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

El ADN de los pacientes se obtiene a partir de linfocitos en sangre periférica empleando el kit comercial (Wizard® Genomic DNA purification kit. Promega).

La región de repetición TA en el promotor de ER α es amplificada mediante PCR en la que el oligonucleótido forward está marcado fluorescentemente en posición 5' con 6-FAM. La longitud del producto amplificado y por consiguiente el número de repeticiones TA se determina mediante electroforesis capilar (ABI PRISM 310, Applied Biosystems).

RESULTADOS

Existe una gran variabilidad en el número de repeticiones TA en la región promotora del gen. El rango varía entre 7 y 24 repeticiones. Existe una distribución similar en la longitud de las repeticiones en ambos grupos de estudio.

CONCLUSIONES

La longitud de las repeticiones TA del promotor del receptor ER α no determina la inclusión del varón en el grupo control (normozoospermicos) o en el grupo pacientes (oligozoospermicos y criptozoospermicos). Se ha analizado también el efecto del número de repeticiones sobre el recuento espermático dentro de cada uno de los grupos de estudio.

003: PATRONES DE DISTRIBUCIÓN DE LOS RECEPTORES DE CANABINOIDES, CB1 Y CB2, EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS FRESCOS, CAPACITADOS Y REACCIONADOS ACROSÓMICAMENTE

M. M. Francou, E. García-Hernández, J. L. Girela, M.J. Gómez-Torres, J. Ten, R. Bernabeu, J. De Juan
Departamento de Biotecnología, Universidad de Alicante
e-mail: manuelafrancou@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Los endocannabinoides son un grupo de derivados de ácidos grasos poliinsaturados que imitan el efecto del Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), principal componente activo de la marihuana ("cannabis sativa"). Los endocannabinoides actúan uniéndose a dos tipos de receptores de membrana: receptor de canabinoide tipo 1 (CB1) y receptor de canabinoide tipo 2 (CB2). En la naturaleza la distribución del CB1 y CB2 es muy diversa: mamíferos, peces, invertebrados, microorganismos y plantas superiores. En humanos, el CB1 es el más abundante en el sistema nervioso central y en tejidos periféricos: hígado, corazón, testículos y útero; en cambio el CB2 está presente principalmente en el sistema inmune. El espermatozoide humano expresa ambos tipos de receptores. La activación del CB1 tiene efectos sobre la motilidad, capacitación y reacción acrosómica. En cambio, la función del CB2 en los espermatozoides aún no está clara, aunque hay estudios que muestran que su activación incrementa la motilidad progresiva.

OBJETIVO

El principal objetivo de este trabajo fue determinar la distribución del CB1 y CB2 en los diferentes estados fisiológicos del espermatozoide: fresco, capacitado y con reacción acrosómica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio se analizaron 15 muestras de donantes normozoospermicos (25-35 años), según los criterios de la OMS (Organización Mundial de la Salud, 2010). Cada muestra fue sometida a capacitación, mediante la técnica de

"swim-up". Una vez capacitados, la reacción acrosómica fue inducida "in vitro" mediante el ionóforo de calcio A23187. Los espermatozoides fueron fijados en cubreobjetos con metanol (-20°C). Las células espermáticas fueron estudiadas en los tres estados fisiológicos: fresco, capacitado y con reacción acrosómica. Las muestras fueron incubadas con anticuerpos primarios anti-CB1 y anti-CB2 y detectados mediante fluorescencia indirecta. El marcaje fluorescente fue analizado mediante microscopía confocal.

RESULTADOS

La distribución de los receptores CB1 y CB2, en la superficie de los espermatozoides, fue evaluada estableciendo los siguientes patrones de marcaje: cola, pieza intermedia, región post-acrosomal y región acrosomal. Así, a cada espermatozoide le fue asignando el/los patrones anteriormente mencionados. En la cola, el porcentaje de expresión del CB1 (10%) fue significativamente mayor que el CB2 (5%). Además, la expresión del CB1 en las colas de espermatozoides en fresco (10%), fue significativamente menor que en aquellos que sufrieron la reacción acrosómica (40 %). De igual forma, la expresión del CB2 en las colas de espermatozoides en fresco (5%) fue menor que en aquellos que sufrieron reacción acrosómica (15%). El porcentaje de espermatozoides marcados en la pieza intermedia y región acrosomal, fue muy bajo, y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados. En la región post-acrosomal, tanto para el CB1 como para el CB2, el porcentaje de espermatozoides marcados disminuyó progresivamente a medida que el espermatozoide fue pasando por los tres

estados fisiológicos estudiados: fresco, capacitado y reacción acrosómica.

CONCLUSIONES

El porcentaje de espermatozoides con marcaje en la cola fue significativamente mayor en aquellos que sufrieron reacción acrosómica que en los frescos, para ambos tipos de receptores CB1 y CB2. Por otra parte, durante la capacitación y reacción acrosómica, el porcentaje de espermatozoides marcados en la cabeza decrece significativamente, especialmente en el CB1. Nuestros resultados sugieren que hay una clara correlación entre la expresión de los receptores de cannabinoides, la capacitación y la reacción acrosómica.

004: EL EFECTO NEGATIVO DE LA FRAGMENTACIÓN DEL DNA ESPERMÁTICO SOBRE LA CALIDAD EMBRIONARIA

J. L. de Pablo¹, C. Anarte¹, A. Domingo¹, I. Ausin¹, J. A. Agirregoikoa^{1,2}, G. Barrenetxea^{1,2}.

¹ Quirón Bilbao, Unidad de Reproducción Asistida, Vizcaya, España. ² Universidad del País Vasco (UPV), Vizcaya, España.
e-mail: jdepablo.bil@quiron.es

INTRODUCCIÓN

Muchos estudios sugieren que las alteraciones en el genoma paterno comprometen la tasa de fecundación, la calidad embrionaria y viabilidad, lo que lleva a abortos espontáneos. El ADN porta la información genética y por ello el espermatozoide debe contener la molécula de ADN íntegra e intacta cuando fecunda al ovocito. Se sabe que la fragmentación de ADN de los espermatozoides es una de las principales causas de esterilidad en el hombre y provoca en ocasiones el fracaso en las Técnicas de Reproducción Asistida.

OBJETIVO

Valorar el efecto de la fragmentación del DNA espermático (FDE) en la fecundación, calidad embrionaria y tasa de éxito en los resultados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo donde se incluyeron 121 ciclos de parejas a las que se les había realizado uno o más ciclos de FIV/ICSI previos fallidos. Quedan excluidos los ciclos del programa de donación ovocitaria.

La FDE se evaluó mediante TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*).

Los pacientes se dividieron en dos grupos. El grupo 1 con alto porcentaje de fragmentación del DNA (≥ 20) y el grupo 2 con fragmentación normal del DNA (< 20).

Los embriones fueron evaluados según los criterios de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR), siendo A la calidad embrionaria óptima, B buena calidad, C calidad regular y D mala calidad embrionaria.

La transferencia se realizó en día 3 del desarrollo embrionario.

El estudio estadístico se llevó a cabo con el programa SPSS V.16 para Mac.

RESULTADOS

No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos ni en la edad ni en el número de ovocitos obtenidos ($p > 0,05$). Sin embargo la calidad embrionaria sí mostró diferencias estadísticamente significativas, siendo mayor el número de embriones de calidad óptima (A) en el grupo 2, ($p = 0,004$).

La tasa de embarazo fue similar en ambos grupos, no mostrando diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ambos grupos.

CONCLUSIONES

Está demostrado que los espermatozoides con el DNA fragmentado pueden fecundar el ovocito con la misma eficacia que los espermatozoides sin DNA fragmentado. Sin embargo, en este estudio la calidad embrionaria sí se ve afectada por la fragmentación, ya que se observa un mayor número de embriones de calidad óptima en día 3 de desarrollo embrionario en el grupo de fragmentación normal, aunque no tiene repercusión en las tasas de embarazo.

Aunque el ovocito maduro tiene la capacidad de reparar el daño moderado en el DNA del espermatozoide, realmente no sabemos bien qué solución se le puede dar a las pacientes con alto porcentaje de fragmentación de DNA. La selección celular mediante la técnica de separación magnética o técnica MACS (*magnetic activated cell sorting*) utilizando Anexina V se ha empleado en muchos campos con el fin de eliminar el porcentaje de células apoptóticas en

diferentes tipos celulares y podría ser una técnica alternativa en este tipo de pacientes.

005: EL USO DE LAS COLUMNAS DE ANEXINA (MACS) EN PACIENTES CON FRAGMENTACIÓN DE ADN EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS MEJORA LA CALIDAD EMBRIONARIA Y LA TASA DE EMBARAZO

Y. Franco, MJ. Lázaro, I. Lizaso, M. García, S. Cornago, N. Maiz, I. Alzola
Centro Sanitario Virgen Del Pilar
e-mail: josufranco@hotmail.es

INTRODUCCIÓN

La fragmentación de ADN espermático (>30%) está asociada con un pobre desarrollo de blastocisto, división desigual, fallos de implantación o pérdida temprana del embarazo. La fragmentación del ADN en espermatozoides es un marcador apoptótico expresado mediante la externalización de fosfatidilserina (PS). La Anexina V es una proteína fosfolípido-dependiente con alta afinidad por la PS.

OBJETIVOS

Evaluar la eficiencia y beneficios del uso de las MACS para la preparación seminal en pacientes con fragmentación de ADN elevada y fallos previos de FIV.

MÉTODOS

Desde Abril de 2010, en las parejas que acuden a nuestro servicio valoramos no sólo el resultado del seminograma, sino también el diagnóstico de la fragmentación de ADN espermático. Después de evaluar la fragmentación en 88 parejas, encontramos en 12 de ellas un resultado mayor del 30% (14% de diagnósticos alterados).

De estas 12 parejas, 4 se habían realizado tratamientos de ICSI previos sin resultado de niño en casa. La calidad embrionaria de estos 4 ciclos, siguiendo los criterios de ASEBIR, fue: 16% de calidad A, 25% de B, 42% de tipo C y 17% de calidad D.

A partir de los resultados obtenidos de la fragmentación espermática, se realizó un ciclo de ICSI a 10 de las 12 parejas, preparando el semen mediante *swim-up* y posteriormente procesando la muestra mediante la técnica de las MACS antes de la realización del ICSI.

RESULTADOS

Tras realizar 10 ciclos de FIV empleando las MACS, hemos observado una mejora en la calidad embrionaria en el momento de la transferencia: 52% de embriones de calidad A, 39% de B y 9% de tipo C, no habiendo embriones de calidad D. Además, en 3 casos se realizó congelación de los embriones sobrantes. Obtuvimos embarazo en 6 parejas (60%), de las cuales 2 abortaron. En otros 2 casos se realizó un ciclo posterior de criotransferencia con resultado positivo.

CONCLUSIONES

El uso de las columnas de Anexina V antes de la realización del ICSI, en pacientes con un elevado porcentaje de fragmentación, resulta efectivo ya que se logra una mejora en la calidad embrionaria. A la vista de nuestros resultados, la identificación de marcadores apoptóticos y el uso de las MACS sería beneficioso para pacientes de FIV con elevada fragmentación y en parejas con fallos previos de ICSI.

006: CAMBIOS CITOMORFOLÓGICOS TRAS LA CONGELACIÓN/DESCONGELACIÓN EN SUJETOS NORMOS, ASTENOS Y OLIGOZOOSPÉRMICOS.

¹MJ. Gómez-Torres, ¹LL. Medrano-López, ^{1,2}A. García, ¹EM. García, ²PJ Fernández-Colom, ¹J. De Juan.

¹Departamento de Biotecnología, Universidad de Alicante.

²Servicio de Ginecología (Reproducción Humana), Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.
e-mail: mjose.gomez@ua.es

INTRODUCCIÓN

La técnica de criopreservación por congelación lenta para espermatozoides humanos es utilizada habitualmente en las clínicas de fertilidad, ya que permite preservar la capacidad fecundante del espermatozoide. Pero es necesario estudiar los efectos que produce el proceso de congelación/descongelación en la ultraestructura del espermatozoide y ver si puede haber correlación con las alteraciones del seminograma. Algunos estudios han demostrado que disminuye la motilidad, la viabilidad y la morfología tras dicho proceso.

OBJETIVOS

Evaluar los daños citomorfológicos que produce la congelación/descongelación en el espermatozoide humano y comprobar si existe correlación entre las alteraciones observadas y la patología seminal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio se utilizaron 33 muestras seminales (16 normozoospermicos, 12 astenozoospermicos y 5 oligozoospermicos) entre voluntarios y pacientes incluidos en el Programa de Reproducción Asistida del Servicio de Ginecología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia. Cada muestra se dividió en dos alícuotas; una se sometió al estudio en fresco y otra al análisis tras congelación/descongelación. El tiempo de crioconservación fue de 7 días en nitrógeno líquido y la descongelación se realizó a temperatura ambiente. Pre y post congelación se evaluaron los siguientes parámetros: morfología con la técnica de Papanicolau y mediante microscopia electrónica de barrido

(MEB); el citoesqueleto mediante la detección de α -tubulina con una inmunocitoquímica indirecta; la integridad del DNA con la técnica TUNEL; la reacción acrosómica espontánea por inmunocitoquímica directa marcando la lectina PSA conjugada con FITC.

RESULTADOS

En cuanto a la morfología, se observó que en muestras en fresco no se dan diferencias significativas entre las tres patologías, sin embargo la alteración más abundante que observamos tras congelación/descongelación fue la presencia de colas enrolladas, hecho que se corrobora con imágenes obtenidas con MEB. Además, en muestras oligozoospermicas descongeladas, se observa un mayor porcentaje de daños en la pieza intermedia que podría ser debido a que la baja concentración de células hace que la concentración de crioprotector sea mayor en estas muestras. El índice de teratozoospermia reveló que las muestras que presentan oligozoospermia tienen un mayor número de defectos combinados tanto en fresco como en descongelado.

Tras la descongelación observamos un mayor porcentaje de espermatozoides que han sufrido la reacción acrosómica tanto en normos, astenos y oligozoospermicos. Los cambios a nivel del acrosoma también se observaron en MEB.

Al estudiar el citoesqueleto, se establecieron tres patrones diferentes para la inmunolocalización de la α -tubulina: marcaje total, discontinuo y segmento final de la cola. En las muestras previas a la congelación en los casos de oligozoospermia, el patrón más abundante fue el marcaje total al compararlo con los normozoospermicos y los astenozoospermicos ($p < 0,05$).

En cuanto al patrón discontinuo, éste fue mayor tanto en normos como en astenozoospermicos versus oligozoospermicos ($p < 0,05$). Por el contrario, tras la descongelación no se encuentran diferencias intergrupales. Además se observó que, tanto antes como después de la congelación, el patrón más abundante fue el total. Sin embargo previa congelación el segundo patrón más abundante fue la fluorescencia discontinua, mientras que en las descongeladas fue el marcaje final.

Con respecto al núcleo, antes de la congelación no encontramos diferencias significativas en el porcentaje de células TUNEL positivas en las tres patologías estudiadas. Sin embargo tras la descongelación observamos un aumento significativo en el porcentaje de células con el ADN dañado solo en las muestras oligo y astenozoospermicas.

CONCLUSIÓN

Según los resultados obtenidos, el proceso de congelación/descongelación afecta en mayor medida al acrosoma, en segundo lugar a la integridad del ADN y por último a la morfología. Estos daños citomorfológicos fueron mayores en las muestras oligozoospermicas tras congelación/descongelación.

007: PREDICCIÓN DE LA IMPLANTACIÓN MEDIANTE ANÁLISIS MULTIVARIABLE BASADO EN LA MORFOCINÉTICA EMBRIONARIA UTILIZANDO UN SISTEMA AUTOMÁTICO DE CINEMATOGRAFÍA.

M. Meseguer, J. Herrero, A. Tejera, T. Viloria, A. Delgado, M.J. De Los Santos
IVI Valencia
e-mail: marcos.meseguer@ivi.es

INTRODUCCIÓN

La observación embrionaria mediante cinematografía permite optimizar la clasificación morfológica y también proporcionar nuevos parámetros cinéticos que pueden ayudar a la selección de embriones viables.

OBJETIVO

Identificar los parámetros morfofocinéticos como los tiempos y los intervalos entre divisiones celulares y las diferencias entre éstos y los embriones que implantaron o no.

METODOLOGÍA

La monitorización embrionaria se realizó con imágenes tomadas cada 15 minutos en 5 planos focales diferentes durante al menos 68 horas en un incubador con una cámara incorporada (EmbryoScope™, Unisense FertiTech, Aarhus Denmark). De los 285 tratamientos de ICSI con 522 embriones transferidos seleccionamos 247 para un análisis detallado basado en la implantación: 100% implantación (n=61) (el número de sacos gestacionales coincidió con el número de embriones transferidos); o 0% de implantación (n=186) (no hubo embarazo bioquímico). El tiempo se expresó en horas tras ICSI e identificamos los tiempos de división a dos células (t2), 3 (t3), 4, (t4) y 5 (t5). La duración del segundo ciclo celular se definió como $cc2=t3-t2$. La sincronía se definió como la duración de la división de 2 a 4 células; $s2=t4-t3$.

RESULTADOS

De los 522 embriones transferidos, un total de 201 implantaron (38,5%). La tasa de embarazo bioquímico fue del 55,1% (n=157) y la de embarazo

evolutivo del 49,8% (n=142). Un total de 50 embriones transferidos presentaron el siguiente comportamiento anormal: división directa de cigoto a 3 blastómeras ($t3-t2 < 5$ hrs) (n=9); tamaño de blastómeras asimétrico en estadio de dos células (volumen de blastómera A $\geq 2x$ el volumen de la B) (N=26); o multinucleación en el estadio de 4 células ($>$ de 1 núcleo en una blastómera) (n=28). De estos 50 embriones solo 4 implantaron (8%). En consecuencia estos comportamientos anómalos se utilizaron como criterios de exclusión morfológica.

Los embriones fueron clasificados en cuartiles con respecto a cada uno de los siguientes parámetros de tiempo t2, t3, t4, t5, s2 y cc2. Aquellos embriones que se situaron en los 2 cuartiles con las mayores tasas de implantación (TI) se agruparon generándose 6 variables binarias. Un análisis de regresión logística aplicada para seleccionar y organizar estas variables binarias encontró que t5 OR=3.31 (CI95% 1.65-6.66) seguida de s2 OR=2.04 (CI95% 1.03-4.07) y cc2 OR=1.84 (CI95% 0.95-3.58) fueron las variables más relevantes para identificar los embriones implantados.

Se generó un modelo jerárquico para clasificar a los embriones en función de su potencial de implantación. El grado menor E cumplía uno o más de los criterios de exclusión y tenía las menores posibilidades de implantar. La aplicación jerárquica de la variable primaria; t5 (si $49.4 \leq t5 \leq 56.5$ hr grado A o B, si no grado C o D) y la variable secundaria: s2 (si $s2 \leq 0.75$ hr grado A o C, si no el B o D) divide los embriones restantes en 4 grados en orden decreciente de TI. Utilizando los criterios basados en cuartiles aseguramos que el número de los embriones transferidos en cada uno

de los 5 grados (A a E) sea casi igual. Para resolver aquellos casos donde los mejores embriones pertenecen a la misma categoría, los grados de A a D se subdividieron por la variable cc2; positiva si $cc2 \leq 12$ hr, negativa en caso contrario. En resumen utilizando este modelo se obtuvieron 9 grados, donde A+ es la categoría con mayores expectativas de TI (70%) y E la menor (8%).

CONCLUSIONES

Los parámetros de *time-lapse* se relacionan con la TI en el presente análisis, generándose un modelo multivariable para estimar la probabilidad de implantación que mejoraría considerablemente el proceso de selección embrionaria.

008: ¿PUEDE LA RESPIRACIÓN EMBRIONARIA PREDECIR LA IMPLANTACIÓN?

A. Tejera¹, J. Herrero¹, N. Ramsing², M. J. De los Santos¹, M. Meseguer¹.

¹IVI Valencia, Laboratorio FIV, Valencia.

²Unisense FertiliTech, Designand Development, Aarhus, Dinamarca.

e-mail: alberto.tejera@ivi.es

INTRODUCCIÓN

La clasificación embrionaria actual que se usa de forma rutinaria en el laboratorio está basada exclusivamente en la evaluación morfológica, siendo subjetiva y poco efectiva. Aunque los embriones transferidos en estadio de blastocisto son capaces de implantar en aproximadamente el 50% de los casos, no todos los embriones pueden alcanzar dicho estadio *in vitro*, por lo que la utilización de marcadores tempranos de evolución podría servir como herramienta útil en la selección embrionaria. El consumo de oxígeno está considerado como uno de los métodos no invasivos más representativos acerca del metabolismo embrionario, pues está directamente relacionado con la producción de ATP durante el desarrollo embrionario, no existiendo antecedentes descritos en la literatura de su uso clínico.

OBJETIVO

Analizar la variación en la tasa de consumo de oxígeno durante todo el desarrollo embrionario e identificar diferencias en los perfiles de respiración entre los embriones implantados vs no implantados con el fin de encontrar marcadores tempranos de predicción de implantación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio prospectivo observacional donde realizamos un total de 47741 mediciones de consumo de oxígeno embrionario en 575 embriones en un programa de donación de ovocitos de 1er ciclo con transferencia a las 72 h post-ICSI. Las tasas de respiración fueron obtenidas mediante el cultivo individual de los embriones en un incubador especial (EmbryoScope, Unisense FertiliTech). A medida que el embrión va consumiendo oxígeno se va

creando un gradiente de concentración de O₂ dentro del pocillo, que es medido por un microelectrodo resultando una tasa de respiración en femtomoles de oxígeno por segundo (fmol/sec).

Las tasas de respiración fueron analizadas por intervalos de tiempo, tomando como referencia el momento de la microinyección. Los intervalos vienen determinados por los cuartiles: I1= <17.2 h; I2= 17.2-35.0 h, I3=35.0-52.1 h, I4= > 52.1 h. El consumo de oxígeno obtenido fue comparado entre los diferentes intervalos, y correlacionado tanto con el destino final del embrión (transferido, T; congelado, C; o no viable, NV), como con la tasa de implantación. De todos los embriones transferidos nos centramos en 57 embriones en los cuales conocimos con exactitud su implantación, ya sea 100% (n=9) donde el número de sacos gestacionales coincidía con el número de embriones transferidos o 0% (n=48).

RESULTADOS

La tasa de respiración embrionaria (RE) fue decayendo de forma significativa (p<0.0001) para cada intervalo de tiempo analizado, siendo I1 = 5.34 fmol/sec (CI95% 5.31-5.36), I2 = 5.17 fmol/sec (CI95% 5.15-5.20), I3 = 4.81 fmol/sec (CI95% 4.78-4.84) e I4 = 4.59 fmol/sec (CI95% 4.56-4.62). Atendiendo al destino final del embrión, en las primeras fases de desarrollo las tasas de RE fueron muy similares para las 3 categorías, pero a medida que continúa su desarrollo encontramos diferencias entre los de mayor calidad

(T o C) y los de peor (NV), siendo éstas más acusadas a partir de las 52,2 horas hasta el momento de la transferencia: 4,96 fmol/sec para los T, 4,94 fmol/sec para los C y 4,57 fmol/sec para los NV. Los embriones que implantaron presentaron una mayor tasa de RE comparados con los que no (p<0.001), encontrando las mayores diferencias a partir de las 52 horas post-ICSI, que podría coincidir con el momento de transición de activación del genoma ovocitario a embrionario.

CONCLUSIONES

La medición del consumo de oxígeno se plantea como un marcador objetivo de calidad embrionaria pudiendo emplearse como criterio de selección temprano. La tasa de respiración de los embriones varía en función del estadio evolutivo, de la calidad de éstos, y de su capacidad para implantar.

Por otro lado la respiración embrionaria en torno al tercer día de desarrollo se correlaciona más fuertemente con el potencial de implantación del embrión.

Hará falta realizar estudios prospectivos que corroboren la utilidad de este parámetro como una buena herramienta de selección embrionaria.

Intervalos de tiempo	I1=<= 17,2	I2=17,2 - 35,0	I3=35,0 - 52,1	I4=>52,2
Embriones no implantados (fmol/sec)	5,75	5,38	4,98	4,86
Embriones implantados (fmol/sec)	6,27*	5,84*	5,55*	5,75*

009: FALLOS DE FECUNDACIÓN TRAS FIV/ICSI: NUEVAS ESTRATEGIAS DE INTERPRETACIÓN PARA EL DIAGNÓSTICO

M. Ferrer, E. Ferrer, M. Muñoz, M. Vila, V. Y. Rawe
CREA, Centro Médico de Reproducción Asistida; Valencia
e-mail: minerva.ferrer@creavalencia.com

INTRODUCCIÓN

La entrada del espermatozoide al citoplasma del ovocito maduro debe provocar la activación ovocitaria, que se inicia con eventos como la reacción cortical y el reensamblaje de los microtúbulos de tubulina en el citoplasma, entre otros. Se producirán oscilaciones de niveles de Ca^{+2} intracelular y una consecuente inhibición del MPF citoplasmático (*Mitosis Promoting Factor*). Éstas son las claves para liberar al ovocito del bloqueo en Metafase II y reanudar el proceso meiótico que culmina con un ovocito de dotación haploide tras la extrusión de su segundo corpúsculo polar. El proceso de fecundación continuará con la formación y correcta aposición de pronúcleos y el inicio del desarrollo embrionario temprano. El uso de métodos de fluorescencia para visualizar estructuras intracelulares se introduce en el laboratorio de embriología como una nueva estrategia de diagnóstico de las causas del fallo de fecundación.

OBJETIVOS

Interpretación y definición de las distintas causas de un fallo de fecundación mediante técnicas inmunocitoquímicas para el diagnóstico en casos de fecundación subóptima (tasa de fecundación < 50 %) o fallos totales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 124 ovocitos que no mostraron pronúcleos dentro del intervalo de 16 a 20 horas post inseminación/microinyección, ni división celular transcurridas al menos 27 horas post inseminación/microinyección.

Tras la eliminación de la zona pelúcida con ácido tyrodes, los ovocitos se fijaron y permeabilizaron con una solución de formaldehído 2% y Triton-X.

El marcaje de tubulina total (citoesqueleto del ovocito) y tubulina

acetilada (flagelo espermático) se realizó con anticuerpos primarios y secundarios Invitrogen-Molecular Probes. El DNA se visualizó usando Hoescht 33342 Invitrogen-Molecular Probes. Se realizó análisis bajo microscopio de epifluorescencia.

RESULTADOS

De 124 ovocitos no fecundados, 16 ovocitos fueron informativos tras FIV (72,7%) y 88 ovocitos tras ICSI (86,3%).

Se observó ausencia de espermatozoide en el ovocito tras la inseminación en un 43,8% en los casos de FIV y en un 14,8% de los casos de ICSI.

Tras la entrada del espermatozoide, el fallo de activación ovocitaria sin formación de pronúcleos ni extrusión del segundo corpúsculo polar se observó en un 31,2% de casos de FIV y en un 53,4% de casos de ICSI.

Situaciones de fallo de activación ovocitaria combinadas con condensación prematura de cromosomas (PCC) aparecen en el 14,8% de los casos, con fallo parcial de descondensación del núcleo espermático en un 20,5% y un 18,2% mostró fallo total de descondensación del núcleo espermático.

Se observan otras situaciones menos frecuentes como defectos en la formación y aposición de pronúcleos (8,6%), detención en la primera división mitótica (2,8%), activación partenogenética derivada de la manipulación (3,8%) y rotura de la inserción cabeza-flagelo espermático o microinyección sobre la placa metafásica del ovocito (0,96%)

CONCLUSIONES

La causa mayoritaria de fallo de fecundación tras un FIV es la

ausencia de espermatozoide en el citoplasma ovocitario. Tras un ICSI la causa principal es la no activación ovocitaria acompañada de fallos de descondensación del núcleo espermático, mientras que la extrusión del espermatozoide por el surco de microinyección es la menos frecuente.

Según la bibliografía la falta de activación ovocitaria puede deberse a una incompetencia citoplasmática, probablemente debida a defectos en la homeostasis del Ca^{2+} y/o a defectos en la inhibición del MPF. En el análisis inmunocitoquímico, esta situación se manifiesta como una condensación prematura de cromosomas paternos (PCC).

En otras ocasiones la falta de activación ovocitaria aparece combinada con defectos en la descondensación del núcleo espermático, sobre todo en casos de baja calidad de los espermatozoides.

La inmunofluorescencia es una herramienta útil para el estudio de alteraciones citoesqueléticas y nucleares en ovocitos y espermatozoides que no fecundaron.

010: MARCAJE DIRECTO DE EMBRIONES DE RATÓN PARA SU IDENTIFICACIÓN MEDIANTE ADHESIÓN DE MICROCÓDIGOS A LA ZONA PELÚCIDA

S. Novo¹, O. Penon^{2,3}, R. Gómez⁴, Ll. Barrios¹, M. Duch⁴, J. Esteve⁴, J. Santaló¹, C. Nogués¹, J. A. Plaza⁴, Ll. Pérez-García^{2,3}, E. Ibáñez¹

¹Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra.

²Departament de Farmacologia i Química terapèutica, Facultat de Farmàcia.

³Institut de Nanociència i Nanotecnologia, Universitat de Barcelona.

⁴Institut de Microelectrònica de Barcelona IMB-CNM (CSIC).

e-mail: sergio.novo@uab.cat

e-mail: elena.ibanez@uab.cat

INTRODUCCIÓN

La correcta identificación de las muestras durante la aplicación de técnicas de reproducción asistida humana es primordial para evitar errores de trazabilidad. Nuestro grupo trabaja en el desarrollo de un sistema de identificación directo para ovocitos/embriones. En un trabajo anterior presentamos un sistema basado en la incorporación de códigos de polisilicio en el espacio perivitelino (1), logrando resultados satisfactorios. No obstante, este sistema muestra limitaciones tales como el uso imprescindible de micromanipulación y que algunos códigos quedan adheridos a la superficie del embrión después de eclosionar. Con el objetivo de superar estas limitaciones, en el presente trabajo se plantea una posible alternativa: un sistema de identificación basado en la incorporación de códigos de polisilicio biofuncionalizados para su adhesión a la zona pelúcida (ZP).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se codificaron embriones en estadio de pronúcleo de la cepa B6CBAF1 con códigos de polisilicio (10 x 6 x 1 µm), fabricados utilizando técnicas de microelectrónica (1). Los códigos fueron biofuncionalizados utilizando la técnica de autoensamblaje de monocapas con la lectina del germen del trigo, la cual se une específicamente a monosacáridos presentes en las glicoproteínas que forman la ZP. Los embriones fueron codificados individualmente mediante el contacto con 10 códigos biofuncionalizados, previamente colocados de forma estratégica para lograr una distribución uniforme sobre la superficie de la ZP.

Tanto la viabilidad (comparada con un grupo no codificado) como la tasa de retención de los códigos fueron determinadas durante las 96h de cultivo. Se realizaron test de identificación cada 24h bajo un microscopio invertido sin la manipulación del embrión, con el objetivo de simular un sistema automático de lectura. Además, la efectividad del sistema de codificación fue testada tras procesos de criopreservación.

RESULTADOS

El desarrollo in vitro hasta blastocisto de los embriones codificados (n=140; 90%) fue equivalente al del grupo control (n=60; 88.3%). Una media de 9.56 ± 0.7 códigos por embrión se mantuvieron unidos a la ZP después de 96 h de cultivo (10 códigos: 65.9%; 9 códigos: 26.2%; 8 códigos: 6.3%; 7 códigos: 1.6%). La tasa de identificación fue evaluada en 100 embriones, obteniendo valores del 95.7% al 97.9% en los diferentes puntos de análisis (cada 24 h). En total, 470 de los 487 procesos identificatorios fueron positivos (96.5%).

Finalmente, se evaluó la validez del sistema de identificación tras procesos de criopreservación. Se codificaron 44 embriones en estadio de pronúcleo y a las 24h de cultivo se congelaron (estadio de 2 células). La viabilidad de los embriones codificados después de la descongelación (95.5%) fue equivalente a la del grupo control (n=30; 90%). La tasa de retención disminuyó a 8.8 ± 1.2 códigos por embrión después de la descongelación, y hasta 8.7 ± 1.2 al final del periodo de cultivo in vitro (10 códigos: 33.2%; 9 códigos: 28.6%; 8 códigos: 16.7%; 7 códigos: 16.7%; 6 códigos: 4.8%). A pesar del descenso

en la retención, la tasa de identificación no se vio afectada y se mantuvo en porcentajes similares (n=171; 97.1%) a los del grupo no criopreservado.

CONCLUSIÓN

Con el sistema descrito en este trabajo, establecemos un método más sencillo de incorporación de códigos a embriones, con una tasa de identificación (96.5%) equivalente a la del método anterior (97%) y que soluciona las limitaciones descritas. El siguiente paso será analizar la viabilidad in vivo de los embriones de ratón codificados y optimizar este sistema de codificación para otras especies de interés, con el objetivo de mejorar la trazabilidad de las muestras asociada a la aplicación de las técnicas de reproducción asistida.

[1] S. Novo, L. Barrios, J. Santaló, R. Gómez-Martínez, M. Duch, J. Esteve, J.A. Plaza, C. Nogués, E. Ibáñez. *Human Reproduction*, 26: 96-105 (2011).

011: PRESERVACIÓN DE LA FERTILIDAD EN PACIENTES ONCOLÓGICAS: COMBINACIÓN DE CRIOPRESERVACIÓN DE TEJIDO OVÁRICO Y MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS

P. Torres¹, E. Novella-Maestre², J.M. Rubio¹, I. Peinado¹, P.Polo¹, M. Romeu¹, M. Andrés³, A. Pellicer¹.

¹Unidad de Reproducción Humana (Servicio de Ginecología), Hospital Universitario La Fe, Valencia.

²Unidad de Genética, Hospital Universitario La Fe, Valencia.

³Unidad de Oncología Pediátrica, Hospital Universitario La Fe, Valencia.

e-mail: patriblanc81@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La criopreservación de tejido ovárico (CTO) ofrece la posibilidad de preservar gametos en pacientes con riesgo a desarrollar fallo ovárico precoz (FOP). Debido a que los folículos antrales presentes en el ovario no sobreviven al protocolo de criopreservación, es posible recuperarlos y complementar la CTO con la Maduración in Vitro (MIV) de ovocitos.

OBJETIVO

Obtener un mayor rendimiento del protocolo de CTO, combinando dicha técnica con la MIV de ovocitos recuperados del tejido ovárico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron 13 pacientes adultas en el programa CTO-MIV: 10 pacientes con cáncer de mama (CM) en etapas I-III, con edad media: 31,5 años (26-40) y 3 pacientes con linfoma de Hodgkin (LH), de edad media: 23,7 años (18-33). Ninguna de las pacientes anteriores había recibido quimioterapia previa al protocolo CTO-IVM. Además, se incluyeron 6 pacientes pediátricas con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) con media de edad de 8,7 años (3-15), 4 de las cuales habían sido tratadas con quimioterapia antes de llevarse a cabo la técnica de CTO-IVM. Previamente a la criopreservación, se aspiraron los folículos antrales visibles (<10 mm) de la superficie cortical ovárica utilizando una aguja de 20g conectada a una jeringa de 1 mL y se cultivaron durante 30-36 h en medio IVM suplementado con FSH, hCG y suero humano inactivado. Se vitrificaron los ovocitos que alcanzaron el estadio de Metafase II tras el periodo de cultivo in vitro.

RESULTADOS

En las pacientes adultas, los niveles séricos de FSH y AMH antes de la CTO-IVM fueron de 4.7 ± 2.3 mU/mL y 27.7 ± 21.7 ng/mL respectivamente, y se recuperó un total de 77 (5.9 ± 5.2) ovocitos: El 83.1 % (4.9 ± 4.3) Vesícula germinal (VG), el 7.8 % (0.5 ± 1.1) Metafase I (MI), el 3.9 % (0.2 ± 0.6) Metafase II (MII) y el 5.2 % (0.3 ± 0.6) ovocitos atrésicos. En las pacientes pediátricas, los niveles séricos de FSH y AMH antes de la CTO-IVM fueron de 2.3 ± 1.0 mU/mL y 4.9 ± 4.7 ng/mL respectivamente y se recuperaron un total de 24 (4.0 ± 2.7) ovocitos: 54.2 % (2.2 ± 1.6) VG, 4.2 % (0.2 ± 1.6) MI, 0 % MII y 41.7 % (1.7 ± 2.7) de atrésicos. Tras 36 horas de cultivo en medio MIV, se obtuvo un 27.1 % (1.5 ± 1.2) de MII en pacientes adultas y un 14.3 % (0.5 ± 0.8) MII en pacientes pediátricas. La tasa de ovocitos degenerados durante el cultivo in vitro fue de 22.9 % (1.2 ± 1.8) en pacientes adultas y de 21.4 % (0.3 ± 0.5) en pacientes pediátricas.

CONCLUSIÓN

La combinación de CTO y MIV de ovocitos inmaduros puede considerarse una opción accesible que amplía las posibilidades de preservación de la fertilidad en pacientes oncológicas con riesgo de fallo ovárico post-tratamiento. Son necesarios futuros estudios para optimizar la formulación de los medios de cultivo de MIV y conseguir disminuir la tasa de degeneración ovocitaria en estos casos.

012: INFLUENCIA DE LAS UNIONES ADHERENTES MEDIADAS POR E-CADHERINA EN LA DERIVACIÓN DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS DE RATÓN

S. González, E. Ibáñez, J. Santaló

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Unitat de Biologia Cel·lular. Facultat de Biociències. Universitat Autònoma de Barcelona.

e-mail: Josep.Santaló@uab.cat

INTRODUCCIÓN

La derivación de líneas de células madre embrionarias (ESCs) a partir de blastómeros aislados se inició con el objetivo de minimizar los problemas éticos derivados de la destrucción de embriones humanos y para incrementar las posibilidades de derivar una línea a partir de un embrión valioso por sus características biológicas.

Las uniones adherentes mediadas por E-cadherina aparecen en el estadio de 8 células y son importantes en la proliferación. Se ha determinado su importancia en el mantenimiento de las líneas de ESCs tanto murinas (mESCs) como humanas (hESCs).

Resultados previos en nuestro laboratorio demostraron un bajo porcentaje de división de los blastómeros únicos aislados en estadio de 8 células (1/8) una vez iniciado el proceso de derivación de mESCs y una baja eficiencia de líneas derivadas a partir de dicho grupo.

OBJETIVOS

El objetivo del presente estudio consiste en determinar la influencia de las uniones mediadas por E-cadherina en la tasa de proliferación de los blastómeros 1/8 y en la derivación de mESCs a partir del mismo grupo.

MATERIAL Y MÉTODOS

La importancia de la E-cadherina se analizó a través de la utilización de una proteína quimérica constituida por el dominio extracelular de la E-cadherina unido a la región Fc de la IgG1 humana (E-cad-Fc). La E-cad-Fc fue unida a la superficie de los blastómeros 1/8 con el objetivo de simular la señalización

producida por la E-cadherina nativa cuando dos o más blastómeros contactan a través de ella.

El análisis del efecto de la E-cad-Fc se analizó en la tasa de proliferación de los blastómeros 1/8 y en la derivación de mESCs y de células madre trofoblásticas de ratón (mTSCs).

RESULTADOS:

UNIÓN DE LA E-CAD-Fc

La E-cad-Fc se unió a la superficie de los blastómeros 1/8 durante una incubación en medio de cultivo DMEM estándar en presencia de calcio, mostrando una distribución simétrica por toda la superficie.

EFECTO DE UNA EXPOSICIÓN LARGA A LA E-CAD-Fc

A las 24 h del inicio del proceso de derivación, se observó que los blastómeros en presencia de la E-cad-Fc incrementaban significativamente la tasa de división (67%; $p=0.003$) respecto al grupo control sin E-cad-Fc (44.6%). Por el contrario, se observó que las colonias que se formaban durante el proceso de derivación eran de tipo trofoblástico y no embrionario, y además, la producción de mESCs fue equivalente al grupo control sin E-cad-Fc.

La producción de líneas de mTSCs también confirmó el incremento en la producción de células trofoblásticas en el proceso de derivación.

EFECTO DE UNA EXPOSICIÓN CORTA A LA E-CAD-Fc

La restricción de la exposición a la E-cad-Fc a 24 h de nuevo incrementó significativamente la tasa de división

a las 24 h y la derivación de mESCs (33.6%; $p<0.0001$) respecto al grupo control sin E-cad-Fc (2.2%), igualando las tasas producidas por el grupo de dos blastómeros aislados en estadio de 8 células (2/8) que presentan uniones de E-cadherina nativa (23.3%).

CONCLUSIONES

La E-cad-Fc durante una exposición de 24 h incrementa la tasa de división de los blastómeros 1/8 y la derivación de líneas de mESCs. Este incremento podría ser consecuencia de la distribución simétrica de la E-cad-Fc que favorecería la formación de células con un fenotipo similar al de la masa celular interna tal como sucede durante el desarrollo embrionario. Una estrategia de este tipo aplicada a embriones de especial interés podría incrementar la eficiencia de derivación de ESC hasta tasas próximas al 95%.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado con la financiación de los proyectos del Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) BIO 2006-11792 y de la Generalitat de Catalunya #2009SGR-00282.

013: REDUCIR LOS ERRORES EN FIV: WITNESSING ELECTRÓNICO

X. Orriols Brunetti¹, S. Bird¹, K. Bennett¹, S. Rogers¹, C. Ottolini^{1,2}, L. Muriel Rios¹, J. Taylor¹, A. Thornhill¹

¹The London Bridge Fertility, Gynaecology and Genetics Centre, Londres, Reino Unido

²Department of Biosciences, University of Kent, Canterbury, Reino Unido.

e-mail: x.brunetti@thebridgecentre.co.uk

INTRODUCCIÓN

Tras varios incidentes que resultaron en la asignación incorrecta de embriones, en 2002 la Autoridad reguladora para la Fecundación Humana y Embriología (HFEA, UK) impuso el doble *witnessing*, es decir, 2 personas necesarias para identificar gametos/embriones en todos los procedimientos de FIV. Sin embargo, el *witnessing* manual, puede generar errores humanos e incrementa la carga de trabajo y distracciones de los embriólogos. Además, la automaticidad involuntaria podría afectar negativamente a la seguridad debido a la repetitividad, el exceso de confianza en la otra persona y en la reducción de la atención.

Para evitar estos problemas, se han desarrollado sistemas automatizados de *witnessing* basados en códigos de barras (Matcher™ y Trusty™) o Etiquetas de Identificación de Radio Frecuencia (RFID) (RI Witness™). Después de valorar los tres sistemas, en diciembre 2010 RI Witness™ fue instalado en The Bridge Centre.

OBJETIVO

En este estudio, el *witnessing* manual y electrónico fueron empleados simultáneamente durante 4 meses para: (a) validar el sistema, (b) evaluar la tasa de error (ej. manipulación de dos placas de distintos pacientes en una misma área de trabajo) y (c) analizar la precisión y tiempo por procedimiento del *witnessing* electrónico.

MATERIALES Y MÉTODOS

RI Witness™ usa tecnología RFID para rastrear y registrar muestras de pacientes en cada proceso de FIV. Campanas equipadas con lectores de RFID y pantallas táctiles registran cada acción. Las etiquetas RFID autoadhesivas se colocan en todos los tubos y placas de cultivo,

permitiendo a los lectores registrar el contenido y la identidad del paciente.

RESULTADOS

420 pacientes fueron tratados entre diciembre 2010/marzo 2011, generando 3694 pasos de *witness*.

Tiempo de procedimientos: Una muestra aleatoria de ciclos (n=18) fue analizada para comparar el tiempo empleado según el *witnessing* manual vs. electrónico. La discrepancia media entre ambos registros fue de 4 minutos y 28 segundos, encontrando la mayor diferencia en una IAC (12 minutos en 3 pasos de *witnessing*).

Asignación manual: Un total de 48/3694 (1,39%) acciones requirieron la asignación manual de RFID por un administrador (ej. procedimientos fuera del sistema prediseñado). Los errores relacionados con la manipulación por embriólogos fueron 17 (35%), probablemente debidos a que el personal se centraba en el *witnessing* manual. 19 (40%) sucesos de etiquetado se relacionan con cortes de luz, fallos del servidor y procedimientos excepcionales fuera de los PNTs. Los 12 sucesos restantes (25%) fueron errores del sistema (ej. configuración incorrecta del diseño del sistema y RFID dañadas).

Errores: La tasa total de error fue de 0,43% (16/3694). Excluyendo 8 errores relacionados con el diseño del sistema (entre ellos, fallos en la configuración inicial del sistema; ej. ciclos que incluyen donación de ovocitos) y etiquetas RFID situadas involuntariamente dentro del radio de lectura pero fuera del área de trabajo (4/3694), la tasa real de error, producida por errores humanos, fue 0,11% (4/3694).

CONCLUSIONES

Comparando con datos de error publicados por laboratorios con

actividades similares entre 0,21% y 5%, la tasa de error real fue 0,11%. Además, la mayor discrepancia de tiempo registrada para un mismo procedimiento (12 minutos) podría ser la diferencia entre el éxito y el fracaso a la hora de efectuar un procedimiento condicionado por el tiempo, como un ICSI.

En resumen, RI Witness™ registra con exactitud todos los procedimientos del laboratorio y detectó una tasa real de error baja. Otros beneficios son la reducción de la carga de trabajo y distracciones, un mayor cumplimiento de los PNTs a la vez que mejora la precisión y eficiencia del *witnessing*, trazabilidad, productividad y auditorías. En un futuro se espera, incluso, ahorrar tiempo por procedimiento al no necesitar la presencia de un segundo *witness* y determinar la verdadera tasa de error de nuestro laboratorio para identificar maneras de reducir o eliminar dichos errores.

014: PAPEL DEL FUNGIBLE EN LA GENERACIÓN DE COMPONENTES VOLÁTILES ORGÁNICOS (CVO) EN EL LABORATORIO DE FIV

F. Marina, N. Pérez, N. Fosas, P. Martín, N. García, S. González, I. Mansilla, M. Roderó, A. Mauri, S. Marina
 Instituto de Reproducción CEFER. ANACER
 e-mail: info@institutocefer.com

INTRODUCCIÓN

A finales de los años 90, descubrimos la importancia de la toxicidad de los llamados componentes volátiles orgánicos sobre nuestros cultivos embrionarios. A raíz de este descubrimiento, los laboratorios se lanzaron a equiparse con toda una serie de filtros para eliminar estos CVOs. La cromatografía de gases puede detectar e identificar qué tipo de CVOs contaminan nuestros laboratorios, pero es un método complejo para emplearlo de rutina. En la actualidad, disponemos de detectores de CVOs de fácil manejo que nos permiten medir la cantidad total de CVOs. En este trabajo pretendemos identificar el papel del material fungible utilizado en los laboratorios de FIV en la generación de CVOs.

MATERIAL Y MÉTODO

Hemos empleado el método de detección por fotoionización (ppbRAE-plus, RAE Systems) para detectar, en tiempo real, partes por mil millones de CVOs. Las medidas se han realizado en el momento de la apertura del paquete conteniendo el fungible y a los 5', 30', 1hora, 4h, 6h y 8h. Se dejó de medir cuando el resultado fue 0 o inferior a 10.

DISCUSIÓN

Los resultados muestran que casi todos los elementos testados emiten CVOs en el momento de la apertura del paquete, pero que rápidamente, con una simple ventilación, son eliminados. Existen importantes excepciones como los tapones de los tubos Falcon de 10 y 5 mL o las jeringas de 1 mL. Los laboratorios de FIV deberían tratar de eliminar todo tipo de fungible que emita CVOs y sustituirlos por material previamente aireado y embrioteestado.

RESULTADOS

Producto	Marca	Referencia	Envase	0	5'	30'	1h	4h	6h	8h
Tubo 15 mL (tapón)	Falcon	352095	91	0						
Tubo 15 mL	Falcon	352095	91	7962	45	9				
Tubo 10 mL (tapón)	Nunc	347856	54	7						
Tubo 10 mL	Nunc	347856	54	252	26	0				
Tubo 10 mL (tapón)	Falcon	352001	2392	1507	615	252	379	40	53	57
Tubo 10 mL	Falcon	352001	2392	4992	44	0				
Tubo 5 mL (tapón)	Falcon	352003	1060	668	193	184	96	20	25	34
Tubo 5 mL	Falcon	352003	1060	1968	0					
Placas 60x15 mm	Falcon	353004	2	4						
Placas 50x9 mm	Falcon	351006	39	0						
Placas 60x15 mm	Nunc	150270	438	4						
Placas 35x10 mm	Nunc	150255	2034	15	0					
Placas 4 pocillos	Nunc	144444	682	26	3					
Jeringa 1mL s/aguja	ICO	14360	6	79	36	11	41	31	1	
Jeringa 1mL c/aguja	ICO	14085	12	73	28	33	18	22	10	
Jeringa 10 mL	ICO	15656	31	235	107	44	38	25	53	27
Pipeta 1 mL	Falcon	357521/22	10	8						
Pipeta 2 mL	Falcon	357507	4	1						
Pipeta 5 mL	Falcon	357543	2	1						
Pipeta 10 mL	Falcon	357551	0	0						
Pipeta 25 mL	Falcon	357525	0	0						
Pipeta Pasteur corta	Brand	747715	0	0						
Pipeta Pasteur larga	Brand	747720	10	10						
Puntas pipeta 100µL	Thermo	94052-200	2104	92	24	9				
Catéter transferencia	Rocket	R57570	18	2						
Catéter inseminación	Gynetics	4220 IUI	29	3						
Catéter transferencia	Wallace	CE123	0	0						
Frasco semen (tapón)	Nirco	180827	60	103	49	37	3			
Frasco semen	Nirco	180827	60	>9999	74	40	4			
Placa Embryoscope	Unisense	FT-S-ES-D	23	0						
Denuding	COOK	K-FPIP-1140-10BS-5	15	0						
Jeringa 1 mL	COOK	K-ATS-1000	20	19						
Tubo 10 ml	NUNC	137860	15	431	15					
Tubo 10 mL (tapón)	NUNC	137860	15	16						

015: LA ELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO COMO ESTRATEGIA DE MEJORA DE RESULTADOS

C. Bou, D. Becerra, M. Testillano, A. Martínez, A. Rodríguez, F. Bronet
 IVI Madrid
 e-mail: carmen.bou@ivi.es

INTRODUCCIÓN

Los embriones *in vitro* están expuestos a un mayor estrés que *in vivo* y su viabilidad depende de la composición, calidad y características físico químicas del medio de cultivo, así como de las condiciones de cultivo. La elección del medio de cultivo a utilizar debe ser dictada por los resultados dentro de su entorno de laboratorio.

OBJETIVOS

Comparar resultados en nuestro programa de ovodonación y en pacientes con ovocitos propios utilizando dos tipos de medios complejos de cultivo embrionario: LIFEGLOBAL y SAGE con el objetivo de sustituir al medio simple HTF utilizado hasta el momento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio prospectivo y randomizado realizado entre Septiembre 2009 y Febrero 2010 de 409 ciclos del programa de ovodonación y 573 ciclos de pacientes con ovocitos propios. En todos los casos la técnica de inseminación ha sido la microinyección y el origen de los ovocitos podía ser tanto fresco como vitrificado.

El análisis estadístico se realizó con Chi cuadrado y t de Student siendo significativa si $p < 0,005$

RESULTADOS

En el grupo de pacientes con ovocitos propios comparamos 332 ciclos con Global y 241 con Sage. No observamos diferencias significativas en tasas de fecundación (71,6 vs 72,0), de gestación clínica (41,3 vs 44,5), de implantación (30,8 vs 33,42) y gestaciones en curso (34,4 vs 37,9), pero sí diferencia significativa en tasa de cancelación (3,92 vs 12,45. $p = 0,0001$).

En las receptoras de ovocitos no vimos diferencia en tasa de fecundación (75,7 vs 75,8), ni de cancelación (25,1 vs 27,2), pero detectamos diferencias en tasa de gestación clínica (63,0 vs 48,1. $p = 0,0043$); de implantación (42,8 vs 32,3. $p = 0,0046$); y de gestaciones en curso (49,1 vs 36,4. $p = 0,0152$). Separamos este grupo en dos subgrupos, ovocitos frescos y vitrificados. Encontramos diferencias significativas entre Global y Sage en el grupo de ovocitos vitrificados en tasa de gestación clínica (69,5 vs 39,7. $p = 0,0003$), implantación (46,5 vs 26,2. $p = 0,0006$) y gestación en curso (57,9 vs 31 $p = 0,0012$). En cambio no había diferencias cuando comparamos los medios en las receptoras de ovocitos frescos.

CONCLUSIONES

Aunque los resultados no son significativos cuando comparamos medios de cultivo en pacientes con ovocitos propios, la utilización de los medios de Sage muestra una tendencia de mejora en particular en la tasa de gestación en curso. En cambio en receptoras de ovocitos la diferencia es claramente significativa a favor del medio Global, sobre todo en ovocitos vitrificados. Por esta razón en nuestro laboratorio decidimos utilizar medios diferentes según el grupo de pacientes.

016: USO DE LA TECNOLOGÍA DE LA LUZ POLARIZADA PARA LA CORRECCIÓN DE LA POSICIÓN DEL HUSO ACROMÁTICO PREVIO AL ICSI

A. Farreras¹, M. Asensio¹, P. Fernández¹, C. Castelló¹, B. Peramo¹, M. López-Teijón^{1,2}, Velilla E¹

¹Institut Marquès, Barcelona; ²Fundación Leonardo Marquès, Barcelona.

e-mail: silvia.fernandez@institutomarques.com

INTRODUCCIÓN

El uso de la luz polarizada en técnicas de reproducción asistida permite la visualización *in vivo* del huso meiótico y la birrefringencia de la zona pelúcida en ovocitos. Se ha descrito que dichos parámetros pueden ser indicativos indirectos de la calidad ovocitaria, elevadas tasas de fecundación y del potencial de desarrollo del futuro embrión. La aplicación de la técnica en la visualización de ultraestructuras ovocitarias tales como el huso meiótico que nos permite localizar y corregir la desviación del huso respecto la posición del corpúsculo polar para realizar la técnica de la ICSI podría ser una herramienta útil para mejorar el pronóstico del ciclo. Se ha descrito que la corrección del huso aumenta las tasas de fecundación y competencia embrionaria en los casos en que se analizan ovocitos propios y se mantienen a cultivo largo, pero se desconoce su utilidad en ovocitos procedentes de donantes para la optimización del programa de donación.

OBJETIVO

Valorar la aplicación de la luz polarizada para la visualización y corrección de la posición del huso meiótico previo a la microinyección en el programa de donación de ovocitos de Institut Marquès en términos de tasa de fecundación, de competencia embrionaria en D+2 y de embarazo evolutivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron un total de 71 donantes del programa de donación de Institut Marquès. Se establecieron dos grupos en función de si se aplicó o no la luz polarizada para la visualización del huso meiótico antes de realizar el ICSI: GI-luz polarizada-ICSI (P-ICSI), GII-Sin luz polarizada (ICSI). En el grupo I se incluyeron 156 ovocitos y se valoró la

presencia o ausencia de huso meiótico así como su desviación respecto al corpúsculo polar. Se observó una desviación del huso respecto al corpúsculo polar en el 82,8% de los ovocitos, que se corrigió colocándolo a las 12h antes del ICSI. En el grupo II se incluyeron 309 ovocitos que se les realizó ICSI sin utilizar el polarizador. Se compararon los resultados obtenidos de tasa de fecundación, de competencia embrionaria y de embarazo en ambos grupos.

RESULTADOS

Se analizaron un total de 465 ovocitos maduros, a 156 de los cuales se les aplicó luz polarizada para la visualización del huso previo al ICSI (GI) y a 309 se les realizó ICSI sin utilizar el polarizador (GII). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de fecundación, 77,7% (GI) vs 78,8% (GII), de división embrionaria en D+2, 97,9 % (GI) vs 98,4% (GII), de embarazo/transfer en D+2, 50,0% (GI) vs 50,0% (GII). La media de embriones transferidos por caso fue estadísticamente equivalente en ambos grupos, 2,1 (GI) vs 2,3 (GII).

CONCLUSIONES

En base a nuestros resultados obtenidos podemos concluir que, en el programa de donación de ovocitos con cultivo embrionario hasta D+2, la aplicación de la luz polarizada para la visualización del huso acromático previo al ICSI y la posterior corrección del huso, no parece mejorar el pronóstico del ciclo.

017: ESTUDIO ALEATORIZADO PARA COMPARAR LA EFICACIA DE DOS ESTRATEGIAS DE TRANSFERENCIA EMBRIONARIA EN UN HOSPITAL PÚBLICO: RESULTADOS PRELIMINARES

A. Clavero, J.A. Castilla, I. Molina, E.R. Palacios, A.P. Ortiz, S. Carrillo, J. Fontes
Unidad de Reproducción. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada
e-mail: ana.clavero.sspa@juntadeandalucia.es

INTRODUCCIÓN

La transferencia electiva de un embrión (SET) se postula como el medio más eficaz en la reducción de los embarazos gemelares en Reproducción Asistida. Sin embargo, queda mucho camino para su implantación definitiva en nuestro medio, ya que constituyeron sólo un 3,6% de las transferencias embrionarias (TE) en hospitales públicos, frente al 21,6% de centros privados. Por ello, creemos necesaria la realización de estudios aleatorizados que apoyen el uso de esta estrategia.

OBJETIVOS

Comparar la tasa de embarazo y de embarazo múltiple de dos estrategias de TE: SET más criotransferencia de un embrión criopreservado y transferencia de dos embriones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio prospectivo aleatorizado, de tres años de duración, durante los que incluiremos a parejas de nuestra Unidad de Reproducción que cumplan criterios de buen pronóstico. Todas las pacientes seguirán un tratamiento de estimulación de la ovulación mediante protocolo de análogo largo. Tras la recuperación ovocitaria se realiza microinseminación espermática (ICSI), transfiriéndose el/los embriones obtenidos al tercer día. Las parejas se asignarán aleatoriamente a uno de los siguientes grupos:

-Grupo 1: SET. El mejor embrión no transferido se crioconserva mediante vitrificación. En caso de no quedar gestante, se realizará un ciclo de criotransferencia de un único embrión.

-Grupo 2: DET.

Se considera embarazo clínico la observación ecográfica de saco embrionario con latido cardiaco a las siete semanas gestacionales. Los datos se analizan mediante test de Chi-cuadrado.

RESULTADOS

Se han incluido a 54 parejas hasta la fecha, habiéndose realizado ICSI, test de β -hCG y ecografía a las 7 semanas a 24 parejas. Además se excluyeron del estudio a 7 parejas (4 por obtener un solo embrión, 2 por gestación espontánea y 1 por cancelarse dos ciclos). La aleatorización incluyó en el grupo 1 a 10 parejas y en el grupo 2 a 14 parejas. Las tasas de embarazo/TE fueron de 60% (6 embarazos) en el grupo 1 y 42,8% (6 embarazos) en el grupo 2, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas. Respecto a los embarazos múltiples, en el grupo 1 la tasa fue del 0% y en el grupo 2 del 50% (3 embarazos múltiples), lo que debido al escaso tamaño muestral tampoco resultó estadísticamente significativo. Calculando el tamaño muestral requerido para alcanzar la significación estadística en este punto, se necesitarían al menos 11 embarazos en cada grupo.

Tras la realización de cuatro desvitrificaciones, la tasa de supervivencia embrionaria fue del 75%, realizándose por tanto 3 criotransferencias que resultaron en una gestación (tasa gestación/crioTE del 33,3%). La tasa acumulada de gestación/ciclo en el grupo 1 ha sido del 70% y un 14,2% de abortos. En el grupo 2 no se registraron abortos. Las tasas de implantación fueron del 53,8% en el grupo 1 y del 32,1% en el grupo 2. En ninguno de estos parámetros encontramos diferencias estadísticamente significativas.

CONCLUSIONES

Las tasas de embarazo obtenidas son elevadas en los dos grupos, lo que indica que los criterios de inclusión parecen ser adecuados.

Dado que el tamaño muestral requerido para alcanzar la significación estadística en la tasa de gestación múltiple es de 11 embarazos en cada grupo, si la tendencia a la elevada tasa de embarazos múltiples en el grupo 2 se confirma en los siguientes ciclos realizados, nos plantearíamos la finalización del estudio por motivos éticos.

La acentuada diferencia en las tasas de embarazos múltiples parece confirmar la adecuada utilización de la transferencia de un embrión en parejas de buen pronóstico, dado que la tasa de embarazo es elevada, y evitamos la principal complicación de la Reproducción Asistida: el embarazo múltiple.

018: TRANSFERENCIA DIFERIDA: ¿PRÁCTICA RUTINARIA?

M. Lierta, C. Roméu, J. Sánchez Rubio, A. Chueca, A. Urries.
 Reproducción Asistida Quirón Zaragoza, Grupo Hospitalario Quirón.
 e-mail: mlierta.zar@quiron.es

INTRODUCCIÓN

La transferencia diferida de embriones resulta una alternativa altamente recomendable en pacientes que por diversas razones no se realizan la transferencia en fresco, como en los casos de: Síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO), mala respuesta endometrial, en casos de DGP donde no se obtienen la cantidad adecuada de embriones y es necesario acumularlos de varios ciclos para asegurar el éxito de la biopsia embrionaria, o incluso en el caso de que la propia pareja por motivos personales decida aplazar la transferencia.

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es comprobar la efectividad de las transferencias diferidas de embriones procedentes de congelación lenta de cigotos en estos supuestos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo realizado sobre 43 pacientes. El análisis se

ha llevado a cabo en parejas que se sometieron a un ciclo de fecundación in vitro y en los que criopreservamos todos los embriones obtenidos. La criopreservación se realizó mediante congelación lenta siguiendo los procedimientos habituales de nuestro laboratorio (Sydney IVF Criopreservation Kit. COOK, Ireland). Los motivos por los que se congelaron cigotos a estas pacientes fueron diversos: Riesgo a desarrollar Síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO), mala respuesta endometrial y decisión de la propia pareja de retrasar la transferencia.

Actualmente, de las 43 pacientes incluidas en el estudio, se le ha realizado transferencias asíncronas a 38 de ellas, permaneciendo criopreservados los cigotos de 5 pacientes a la espera de la transferencia embrionaria.

RESULTADOS

Los resultados se han analizado en base a la edad de las pacientes (tabla 1).

CONCLUSIÓN

La criopreservación embrionaria en Día+1 y posterior transferencia diferida es una técnica que realizamos actualmente de forma rutinaria en los casos de SHO y mala preparación endometrial. Como observamos en los resultados, todas las pacientes que incluimos en el estudio llegaron a realizarse transferencia de embriones. Las tasas de supervivencia de los cigotos, próximas a un 80% y las tasas de gestación cercanas a un 60% nos permiten realizar transferencias diferidas sin comprometer la calidad embrionaria ni las tasas de embarazo. En base a ello, se puede concluir que la congelación y descongelación de cigotos es una buena opción para aquellas pacientes que por diversas razones deben posponer la transferencia de embriones, convirtiendo la transferencia diferida en una práctica rutinaria en el laboratorio de reproducción asistida.

	< 30 años	30-35 años	>35 años	TOTAL
Nº parejas incluidas	19	15	9	43
Nº parejas con descongelación embr.	18	13	7	38
Edad (media ± DE)	24,7±3,1	33,7± 1,2	38,2 ± 2,4	30,7±6,1
Emb.cong. D+1 (N,media ± DE)	158(9,9±3,7)	126(9,7±3,7)	64(8±2,1)	348(9,4±3,4)
Emb. descong.D+1 (N,media ± DE)	113(7,5±3,4)	91(7,5±2,2)	46(8±1,9)	250(7,6±2,7)
nº de emb. que sobreviven	95	58	38	191
Tasa de supervivencia	88%	64%	82%	76%
nº transferencias	18	13	7	38
Emb. transfer/pac. (media ± DE)	2,1±0,6	2,2±0,4	2,3±0,5	2,1±0,5
nº de emb. re-congelados	28	17	20	65
nº gestaciones	12	7	3	22
Tasa de gestación	67%	54%	43%	58%

Tabla 1

019: EL DGP MOLECULAR COMBINADO CON MICROARRAYS DE CGH: UNA NUEVA ESTRATEGIA DIAGNÓSTICA

T M Alberola, R Bautista-Llàcer, C Sánchez-Matamoros, M Pardo, E García-Mengual, X Vendrell
Sistemas Genómicos
e-mail: javier.vendrell@sistemasgenomicos.com

INTRODUCCIÓN

El DGP de enfermedades monogénicas permite identificar embriones libres de ellas, pero no ofrece información sobre la ploidía del embrión. Existen evidencias de elevadas tasas de aneuploidía en embriones humanos preimplantación. Algunos autores registran tasas de hasta el 60%. Históricamente, la literatura recoge resultados combinados de DGP de enfermedades monogénicas y de aneuploidías en células embrionarias diferentes (biopsiando dos células en D+3), en estudios realizados sobre el mismo embrión en diferentes estadios de división (biopsia de corpúsculo polar combinada con biopsia de blastómeros y/o trofotodermo) y para un número limitado de cromosomas. No obstante, no existen registros publicados de casos de un estudio genético molecular combinado con *microarrays* de CGH en D+3 y en una sola célula.

OBJETIVOS

Presentar una nueva aproximación diagnóstica que combina las técnicas de PCR y *microarrays* de CGH simultáneamente y en la misma célula embrionaria, permitiendo así obtener el diagnóstico genético molecular de la enfermedad monogénica y el estudio de aneuploidías para los 24 cromosomas. También se puede aplicar a las parejas portadoras de dos anomalías genéticas, una molecular y otra cromosómica (reordenamientos cromosómicos equilibrados).

MATERIAL Y MÉTODOS

La amplificación del genoma de una única célula (amniocitos, linfocitos o blastómeros de embriones en D+3) se realiza con el "Sureplex Amplification System" de BlueGnome con modificaciones. Los cambios introducidos consiguen una amplificación conjunta del genoma total,

enriquecida en las regiones moleculares a estudiar. A partir de la amplificación obtenida, con una parte del producto se realiza una PCR "heminested" específica de las regiones moleculares a analizar (mutación y microsatélites de apoyo en el diagnóstico) con oligonucleótidos fluorescentes, seguida de una electroforesis capilar y el análisis de fragmentos. Por otro lado, otra parte del ADN amplificado se marca e hibrida junto con un ADN de referencia de varón en los *microarrays* 24Sure o 24Sure+ (BlueGnome). La lectura se realiza con el DNA Microarray Scanner G2565CA de Agilent a una resolución de 10µm y se analizan con el software BlueFuse Multi de BlueGnome®. El resultado conjunto está disponible en 24-28h.

Antes de proceder al DGP se requiere un estudio de informatividad para determinar el éxito de la amplificación conjunta y la detección de la/s mutación/es causante/s de la enfermedad monogénica. Esta validación se realiza en linfocitos aislados de ambos miembros de la pareja.

RESULTADOS

Esta metodología se ha puesto a punto para el análisis conjunto de 24 cromosomas con la Distrofia Miotónica de Steinert, la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, la Hemofilia A y el Síndrome de Marfan. Además, también se ha puesto a punto para una pareja en la que la mujer es portadora del Síndrome de Alport ligado al X y su pareja es portador de la translocación equilibrada 46,XY t(9;22)(q34;q11.2).

CONCLUSIONES

El DGP molecular combinado con *microarrays* de CGH permite estudiar cualquier enfermedad monogénica en la que esté determinada la mutación causal, reordenamientos cromosómicos estructurales y la ploidía de todos

los cromosomas simultáneamente y en un solo blastómero. La principal ventaja de esta nueva aproximación diagnóstica es que se determinan los embriones no afectados y euploides, aumentando al máximo la probabilidad de implantación. Además, el estudio es compatible con la transferencia en fresco, sin necesidad de vitrificar, rebiopsiar en diferentes estadios o biopsiar más de una célula.

O20: DGP PARA ESTUDIO DE ANEUPLOIDÍAS DE 24 CROMOSOMAS MEDIANTE ACGH: DIAGNÓSTICO EN CÉLULA ÚNICA DE DÍA 3 VS. BIOPSIA DE TROFOECTODERMO DE DÍA 5

L. Rodrigo, P. Mir, E. Mateu, A. Mercader, A. Cervero, P. Buendía, J. Martín, C. Rubio
Departamento de Diagnóstico Genético Preimplantacional. Instituto Universitario IVI-Valencia. Valencia, España.
e-mail: Lorena.Rodrigo@ivi.es

INTRODUCCIÓN

La aparición de los array de CGH (aCGH, Hibridación Genómica Comparada de alta resolución) junto al desarrollo de técnicas de amplificación del genoma completo de célula única, han abierto las puertas a una nueva tecnología para el estudio de alteraciones en el contenido cromosómico completo en embriones humanos antes de producirse la implantación.

OBJETIVOS

Describir los resultados clínicos del programa de Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) para estudio de aneuploidías de 24 cromosomas mediante aCGH en célula única de día 3 de desarrollo. Comparar la calidad del diagnóstico con el obtenido mediante aCGH en biopsia de trofoectodermo de día 5.

MATERIAL Y MÉTODOS

Entre Febrero de 2010 y Mayo de 2011, se analizaron los resultados de 28 ciclos de DGP mediante aCGH en parejas con edad materna avanzada (n=5), aborto de repetición (n=13), fallo de implantación (n=7) y otras causas (n=3). La edad media de las pacientes fue 38,3±3,4.

Se realizó biopsia embrionaria en día 3 de desarrollo en 139 embriones, y amplificación genómica en célula única utilizando el kit comercial Sureplex®. Para el estudio de aneuploidías de los 24 cromosomas mediante aCGH se utilizó la plataforma comercial 24sure®, realizando un protocolo de 24 horas que incluye la amplificación, marcaje del ADN, hibridación, lavados, escaneo y análisis de datos (BlueGnome Ltd., Cambridge, UK).

En día 5 de desarrollo, 39 embriones diagnosticados como anormales en día 3 fueron reanalizados mediante FISH (hibridación *in situ* fluorescente) utilizando sondas de ADN fluorescentes dirigidas a los cromosomas alterados (Vysis Inc. Downers Grove, IL, USA). Adicionalmente, a un grupo de 15 blastocistos de calidad óptima se les realizó biopsia de trofoectodermo para su análisis mediante aCGH y posterior fijación del resto del blastocisto para reanalizarlo mediante FISH.

RESULTADOS

Un total de 135 células de día 3 amplificaron correctamente (97,1%). De los 135 embriones analizados, 91 fueron diagnosticados como anormales mediante aCGH (67,4%); el 31,9% de los embriones (29/91) presentaron aneuploidías únicamente para alguno de los cromosomas analizados rutinariamente en nuestro programa de FISH (cromosomas 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X, Y); el 47,3% (43/91) presentaron además aneuploidías para otros cromosomas; y un 20,9% (19/91) tuvieron aneuploidías únicamente para cromosomas diferentes a los 9 analizados rutinariamente en nuestro programa de FISH. Concretamente, las pacientes ≥41 años presentaron una incidencia más baja de embriones con anomalías sólo para cromosomas no analizados por FISH (17,1%) comparado con las pacientes ≤40 años (23,2%), siendo especialmente baja (13%) en pacientes cuya única indicación para realizarse DGP fue edad materna avanzada (edad media: 42,6±1,5). Además, esta incidencia fue más alta (44,4%) en pacientes ≤40 años con factor masculino severo (concentración ≤5x10⁶ espermatozoides/ml).

Se realizó transferencia embrionaria en 21 ciclos (75%), observándose

gestación evolutiva en 14 ciclos (50% por ciclo; 66,7% por transfer), con una tasa de implantación del 50%.

El reanálisis en día 5 confirmó el diagnóstico obtenido mediante aCGH en día 3 en 38 embriones (97,4%). El análisis mediante aCGH en biopsia de trofoectodermo mostró un 93,3% (14/15) de concordancia con el diagnóstico mediante aCGH en día 3. El embrión discordante fue diagnosticado como aneuploide caótico en día 3 pero como normal en día 5 sobre biopsia de trofoectodermo. En este caso, el reanálisis mediante FISH en día 5 del resto del blastocisto confirmó el diagnóstico obtenido en día 3, mostrando un patrón de aneuploidías caótico en las células de todo el embrión.

CONCLUSIONES

La técnica de aCGH resulta adecuada para el diagnóstico de célula única en día 3 de desarrollo, ofreciendo buenas tasas de amplificación y de diagnóstico fiable. En este estudio, la biopsia de trofoectodermo en día 5 no mejora la calidad del diagnóstico en comparación con el día 3.

021: ERROR DE DIAGNÓSTICO DE LA TÉCNICA DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL PARA 24 CROMOSOMAS MEDIANTE FISH

E. Toro¹; S. Fernández^{1,2}; A. Colomar^{1,2}; S. Chamosa¹; M. López Teijón³, E. Velilla^{1,2}

¹Institut Marquès, Barcelona;

²Centro de Medicina Embrionaria, Barcelona-Madrid;

³Fundación Leonardo Marquès, Barcelona.

silvia.fernandez@institutomarques.com

INTRODUCCIÓN

Hasta ahora, el Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) mediante FISH (hibridación *in situ*) analizaba 9 o 12 cromosomas. Recientemente, nuestro grupo ha solventado las limitaciones de la técnica de FISH para poder realizar DGP de todos los cromosomas. El error de diagnóstico de FISH en blastómero, puede ser debido a dos factores, el propio de la técnica y el debido a mosaicismo embrionario. Este error de diagnóstico debe ser optimizado por cada laboratorio y debe estar bajo permanente control mediante el reanálisis de todas las células del embrión, siendo un marcador de calidad del laboratorio. Los trabajos publicados hasta el momento para la validación de DGP de 24 cromosomas, analizan un número limitado de cromosomas en día +5 mediante FISH para establecer el error de diagnóstico de la técnica utilizada en el DGP (CGH o aCGH).

OBJETIVOS

Determinar el error de diagnóstico real del DGP para 24 cromosomas (DGP-24) mediante FISH y compararlo con el del análisis clásico de 9 cromosomas (DGP-9).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron en este estudio 58 pacientes con ciclos de DGP-9 y 22 pacientes con ciclos de DGP-24 indicados por presentar alguno o varios de los siguientes factores de riesgo: abortos de repetición, edad materna avanzada (>37), factor masculino genético y fallo de FIV.

Todos los embriones alterados o los normales que en día +5 no fueron

transferidos o vitrificados, se fijaron y se analizaron mediante FISH para las mismas sondas utilizadas en día 3 (n= 185). Se establecieron dos grupos según el número de cromosomas incluidos en el reanálisis: DGP-9 cromosomas y DGP-24 cromosomas.

El análisis de los embriones se realizó mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) utilizando sondas oligonucleótidos (Cellay), centroméricas y *locus* específicas (Vysis). La técnica de DGP-9 se realizó mediante 2 rondas de hibridación y la de DGP-24 se realizó mediante 6 rondas de hibridación consecutivas. Siempre que fue necesario se realizaron una o dos rondas con sondas subteloméricas (Vysis; Kreatech) para reanalizar las monosomías tanto en DGP-9 como en DGP-24.

Posteriormente se determinó como error de diagnóstico aquel resultado no concordante de normalidad o anormalidad en día 5 respecto al diagnóstico de día 3.

RESULTADOS

Se analizaron 185 embriones a día 5 de desarrollo (107 DGP-9 y 78 DGP-24) con una media de 25,4 núcleos analizados por embrión. Se descartaron del estudio aquellos embriones que presentaban menos de 6 núcleos. El error de diagnóstico obtenido, es decir discrepancia en los resultados entre día 3 y día 5, fue de un 3,7% (4/107) en DGP-9 y en un 5,1% (4/78) en DGP-24 siendo en todos ellos falsos positivos. Estas diferencias no son estadísticamente significativas (P=0,92) y por tanto el error de diagnóstico de DGP-24 es equivalente al de DGP-9.

CONCLUSIONES

Estos son los primeros datos reportados de reanálisis de todos los cromosomas del embrión en día 5 mediante FISH. Estos resultados indican: (i) el error de diagnóstico de la técnica de DGP para 24 cromosomas mediante FISH es equivalente a la establecida para el DGP de 9 cromosomas, por tanto es independiente del número de cromosomas a estudiar (ii) el error de diagnóstico de DGP mediante FISH para 24 cromosomas es del 5,1% (iii) el error de diagnóstico de DGP-24 establecido valida totalmente la técnica de DGP-24 mediante FISH, valor muy inferior al aceptado por los diferentes PGD *guidelines* (iv) la determinación del error de diagnóstico mediante el reanálisis de todos los cromosomas en día +5 utilizando la misma técnica utilizada en día +3, debería ser la única estrategia válida para determinar dicho error.

022: DIAGNÓSTICO PRENATAL NO INVASIVO (DPNI) EN SANGRE DE GESTANTE: UNA NUEVA OPCIÓN TRAS DGP

A. Bustamante-Aragonés, S. Perlado, M.J. Trujillo-Tiebas, J. Gallego, L. Rodríguez*, C. Linares*, M. Rodríguez de Alba, I. Lorda, J. Plaza*, C. Hernández*, C. Ramos.

Servicios de Genética y Ginecología y Obstetricia*. Fundación Jiménez Díaz, Madrid

e-mail: abustamante@fjd.es

INTRODUCCIÓN

En 1997 Lo y cols. descubrieron la presencia de ADN fetal circulando en el torrente sanguíneo materno. Desde entonces varios grupos han estado trabajando y poniendo a punto diferentes técnicas para el diagnóstico de diversas enfermedades fetales en sangre de gestante.

Como fruto de estas investigaciones, numerosas unidades de diagnóstico prenatal ya han incorporado en la práctica clínica la determinación del sexo y RhD fetal en la sangre materna.

Sin embargo, el estudio de enfermedades monogénicas sigue en el plano de la investigación. Además, la peculiaridad de la muestra a estudiar limita estos estudios a enfermedades dominantes de origen paterno, recesivas en las que la mutación portada por ambos progenitores sea distinta o riesgo de mutaciones *de novo*.

Según las indicaciones reflejadas en las guías de buena praxis de la ESHRE, en embarazos tras un proceso de FIV-ICSI con DGP, se debe recomendar la realización de un diagnóstico prenatal (DP). El asesoramiento debe realizarlo una persona cualificada y exponer a la pareja las distintas opciones disponibles tanto invasivas (biopsia de corion y amniocentesis) como no invasivas (ecografía y diagnóstico no invasivo en sangre materna).

Las parejas que consiguen un embarazo tras el duro y largo proceso físico y emocional que conlleva un DGP, revocan la confirmación del estatus fetal mediante las pruebas invasivas de diagnóstico prenatal. Es por ello que la aplicación del DPNI en sangre materna representa para algunos pacientes de DGP una nueva opción diagnóstica sin poner en peligro la gestación.

OBJETIVOS

Incorporación del DPNI a la confirmación de resultados tras embarazo por DGP.

MATERIAL Y MÉTODOS

La metodología de estos diagnósticos incluye la obtención del plasma materno para la posterior extracción del ADN fetal, así como obtención de ADN genómico de ambos miembros de la pareja.

Actualmente hemos realizado 203 determinaciones no invasivas en 30 patologías de distinta base genética.

La aproximación para las patologías ligadas al X se realizó mediante determinación del sexo fetal en sangre materna, por PCR a tiempo real. Éstas suponen un total de 174 DPNI, incluyendo 5 casos de gestaciones tras DGP.

La aproximación al estudio de patologías con herencia autosómica supone un total de 29 casos. En función de su base molecular se realiza el estudio mediante minisequenciación y/o QF-PCR. Entre las patologías estudiadas están la Enfermedad de Huntington, Fibrosis Quística, Acondroplasia, Acidemia Propiónica, Epidermolisis Bullosa, E. McKusick, Amaurosis Congénita de Leber.

RESULTADOS

No hubo errores diagnósticos en las determinaciones del sexo fetal. Cinco gestantes de DGP por enfermedad ligada al X optaron por el DPNI evitando estudios invasivos posteriores.

En 27/29 (93%) casos de enfermedades con herencia autosómica se llegó a un correcto diagnóstico ya que los resultados en plasma materno fueron concordantes con los obtenidos en DP invasivo. Dos de estos casos, rehusaron

al DP invasivo. Uno se confirmó al nacimiento y el otro finalizó en un aborto espontáneo.

En 2/29 (7%) casos hubo ausencia de diagnóstico en plasma materno.

CONCLUSIONES

El diagnóstico fetal en sangre materna es posible y su aplicación en el DGP es muy prometedora, ya que ofrece una nueva opción diagnóstica a parejas en las que está recomendado realizar un diagnóstico prenatal, pero que no quieren poner en riesgo la gestación con pruebas invasivas.

Nuestro agradecimiento a Marisa Pérez-Bellot por su esfuerzo y dedicación en la recogida de las muestras.

Este proyecto está financiado por ISCIII-PI081456. S. Perlado es becaria de la Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz.

O23: MOSAICISMO EN PACIENTES CON SÍNDROME DE KLINEFELTER: IMPLICACIONES EN EL CONSEJO GENÉTICO REPRODUCTIVO

L. García-Quevedo¹; J. Blanco¹; Z. Sarrate¹; LL. Bassas²; V. Català³; F. Vidal¹

¹Unitat Biologia Cel·lular. Universitat Autònoma Barcelona. Bellaterra, Barcelona.

²Laboratori d'Andrologia, Fundació Puigvert. Barcelona.

³Prenatal Genetics, SL. Barcelona.

e-mail: lydia.garcia@uab.cat

INTRODUCCIÓN

El síndrome de Klinefelter es la anomalía cromosómica más común en hombres infértiles. Se estima que el 9-11% de los pacientes azoospermicos presentan este tipo de aneuploidía. El diagnóstico citogenético se realiza mediante el cariotipo de 20-50 metafases procedentes de linfocitos de sangre periférica y determina que alrededor del 80% de los pacientes presentan un cariotipo homogéneo 47,XXY. A pesar de que la mayoría de los pacientes son azoospermicos, algunos presentan focos aislados de espermatogénesis y producen espermatozoides. Estas trazas de espermatogénesis se han relacionado con la presencia de células 46,XY en tejido testicular. La estrategia asistencial consiste en la extracción de espermatozoides testiculares (TESE) para la aplicación posterior de ICSI.

El objetivo de este estudio ha sido evaluar la presencia de mosaicismo en diferentes tejidos de pacientes diagnosticados como Klinefelter puros candidatos a TESE/ICSI. Paralelamente se ha determinado la competencia meiótica del linaje 47,XXY así como el riesgo genético reproductivo que presentan los individuos afectos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron ocho pacientes con síndrome de Klinefelter (KS1-KS8) diagnosticados como puros mediante cariotipo en sangre periférica. De cada paciente obtuvimos tres tipos de material de estudio: biopsia testicular, frotis bucal y sangre periférica (excepto KS5).

Las biopsias testiculares se obtuvieron bajo evaluación andrológica con el objetivo de congelar el tejido para realizar un tratamiento de ICSI. Una parte de cada biopsia fue derivada a este estudio. Las muestras se procesaron para realizar

un análisis citogenético siguiendo los protocolos estandarizados en nuestro laboratorio.

Se evaluó la presencia de células 46,XY y 47,XXY mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) con sondas centroméricas para los cromosomas X, Y, 18. En las extensiones de células testiculares se aplicó la misma combinación de sondas y además un pintado cromosómico para los cromosomas sexuales con la finalidad de evaluar su comportamiento y la competencia meiótica de las células aneuploides.

Para cada individuo estudiado se analizaron 500 linfocitos, 200 células epiteliales y 1000 células testiculares (células germinales pre- y post-meióticas y células de Sertoli). Además fueron evaluadas todas las figuras meióticas observadas.

RESULTADOS

Se observaron dos poblaciones celulares (46,XY y 47,XXY) en los ocho pacientes para los 3 tejidos analizados. El porcentaje de células 46,XY fue claramente diferente entre tejidos, siendo el porcentaje más bajo el de linfocitos y el más alto el de tejido testicular. Los resultados del porcentaje de células 46,XY fueron los siguientes:

Linfocitos: 2.7%(KS1), 3%(KS2), 8%(KS3), 5.5%(KS4), 8.6%(KS6), 5.5%(KS7), 3%(KS8).

Células de la mucosa bucal: 18.2%(KS1), 33.3%(KS2), 33.2%(KS3), 16.2%(KS4), 8.7%(KS5), 12.4%(KS6), 12%(KS7), 10.3%(KS8).

Células de Sertoli: 45.5%(KS1), 54%(KS2), 24.3%(KS3), 41.4%(KS4), 46.5%(KS5), 69.4%(KS6), 60.9%(KS7), 68.8%(KS8).

Células Pre-meióticas: 45.2%(KS1), 42.5%(KS2), 40.2%(KS3), 26%(KS4),

28.2%(KS5), 63.7%(KS6), 14.6%(KS7), 30.4%(KS8).

Se observaron coeficientes de correlación elevados entre el porcentaje de células 46,XY de mucosa y de Sertoli, y entre el de mucosa y el de células germinales.

En cuatro de los ocho pacientes analizados se identificaron profases I y metafases I (KS1, KS2, KS5, KS8) que en todos los casos fueron 46,XY. Todos los pacientes mostraron un incremento significativo de hiperhaploidías XY.

CONCLUSIONES

En individuos KS, la determinación del cariotipo en linfocitos se debería contrastar con los resultados de otros tejidos. La mucosa bucal es un tipo celular fácil de obtener que muestra resultados de mosaicismo más representativos del estatus testicular.

Los individuos Klinefelter que presentan focos de espermatogénesis son mosaicos. Nuestros datos refuerzan la hipótesis de incompetencia meiótica de la línea 47,XXY, y confirman que la espermatogénesis observada está relacionada con la presencia de células 46,XY.

Las células post-meióticas hiperhaploides proceden de células 46,XY. Un microambiente testicular anormal podría ser la causa subyacente del incremento de células cromosómicamente anormales.

AGRADECIMIENTOS

Estudio financiado por los proyectos SGR2009-282 (Generalitat de Catalunya) y CF-180034 (Universitat Autònoma Barcelona). Agradecemos al laboratorio de Andrología de la Fundación Puigvert (Barcelona) y a Prenatal Genetics, SL (Barcelona) el suministro de las muestras.

024: DETECCIÓN MEDIANTE SNAPSHOT DE LA DELECCIÓN EN HOMOCIGOSIS DEL GEN SMN1 EN EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL DE ATROFIA MUSCULAR ESPINAL

M. Martínez-Fresno¹, A. Gómez Duro¹, P. Eibes Peteiro¹, A. Sotillo¹, E. Gomez², E. Fernández¹

¹Geniality Diagnóstico Genético

²Instituto Tahe de Fertilidad y Ginecología, Murcia

e-mail: mmfresno@geniality.es

INTRODUCCIÓN

La Atrofia Muscular Espinal tipo I (AME) también conocida como síndrome de Werding-Hoffman, es una enfermedad genética de carácter autosómico recesivo causada por la delección de los exones 7 y 8 en homocigosis en el gen SMN1 (> 92% de los casos), situado en el brazo largo del cromosoma 5 en 5q11.2-13.3. Es la segunda causa principal de enfermedad neuromuscular con una incidencia de 1:10000. Presentamos el caso de una pareja que consulta porque han tenido una niña, fallecida y diagnosticada posteriormente como afecta de AME. La dificultad en el desarrollo del diagnóstico molecular de AME reside en que el gen causal, SMN (*Survival motor neuron*), posee dos copias altamente homólogas, SMN1 (copia telomérica) y SMN2 (copia centromérica). El análisis de la delección de los exones 7 y 8 en SMN1 implicados en la AME produciría una amplificación positiva y homóloga en SMN2, cuyos exones no se encuentran delecionados en la AME y como consecuencia no sería posible discriminar la presencia o ausencia de delecciones en SMN1. Por otro lado la delección en SMN1 se detecta como una ausencia de amplificación que puede confundirse con un *allele drop-out* o un fallo de amplificación total.

OBJETIVO

Desarrollo de un método basado en minisequenciación o SNaPshot (técnica usada en la detección de mutaciones puntuales) para la detección en homocigosis de la delección de los exones 7 y 8 del gen SMN1 empleando como control de amplificación el gen SMN2.

MATERIAL Y MÉTODOS

El Diagnóstico Genético Preimplantacional se realizó en una pareja en la que ambos eran portadores de la delección



Figura 1a. Loci SMN1y SMN2 en cromosoma 5 (5q11.2-13.3)

de SMN1 en heterocigosis. Tras un ciclo de fecundación *in vitro* se biopsiaron 6 blastómeros de cinco embriones en día +3 post -inseminación. La lisis celular (lisis alcalina), la amplificación directa del genoma (mediante "Multiple Displacement Amplification") y las PCRs Multiplex se realizaron usando los protocolos validados con anterioridad en el laboratorio.

Las secuencias SMN1 y SMN2 se alinearon con el software "MegAlign" para detectar cambios nucleotídicos entre ellas. Estas dos copias difieren únicamente en cinco nucleótidos intrónicos y tres exónicos. Se seleccionó un nucleótido en el exón 7, citosina (c) en SMN1 y timina (t) en SMN2, que se puede analizar mediante minisequenciación. Esta diferencia permite detectar la delección en los pacientes afectados (solo amplifica gen SMN2) y discriminar entre afectados y sanos o portadores/sanos (Figura 1a y 1b).

Se incluyó en el análisis, el estudio de 5 marcadores polimórficos que flanquean los loci SMN1 y SMN2: D5S2019, D5S610, D5S435, D5S1491 y D5S637, lo que permitió establecer en la pareja y su hija, el haplotipo asociado a la delección. Los fragmentos de amplificación de los marcadores mediante Multiplex PCR y el estudio de la delección mediante SNaPshot se analizaron posteriormente en secuenciador ABI 3130xl.

RESULTADOS

Los 5 embriones analizados en el DGP pudieron diagnosticarse, siendo dos portadores sanos de la delección, dos afectados y uno sano. La técnica de SNaPshot diseñada tuvo una eficiencia de amplificación del 100%. Se transfirieron dos embriones sin resultado de embarazo positivo.

CONCLUSIONES

La complejidad existente en el diagnóstico de la AME reside en la presencia de un gen homólogo (SMN2) y delecciones de gran tamaño, elementos que dificultan en gran medida el diagnóstico genético en una sola célula. El protocolo desarrollado basado en la combinación del SNaPshot y el análisis de STRs solventa esta problemática y permite el correcto diagnóstico de los tres genotipos posibles: embriones afectados, embriones sanos y portadores sanos. Este método permite además evitar errores diagnósticos que se producirían por la ausencia de amplificación que produce la delección y la amplificación del gen homólogo, empleado aquí como control positivo.

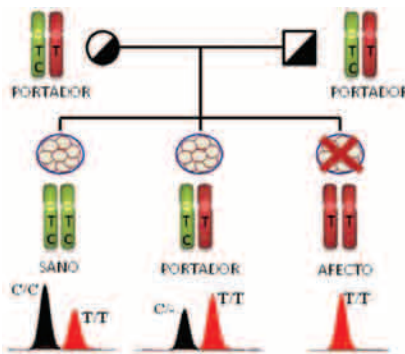


Figura 1b. Electroferogramas de SNaPshot obtenidos de los distintos genotipos posibles en la AME: sano, portador-sano y afecto

**COMUNICACIONES
PÓSTER**

001: APLICACIÓN DE LA CGH RÁPIDA EN EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL DE TRANSLOCACIONES: CASO DE UN PORTADOR DE UNA DOBLE TRANSLOCACIÓN

M. Rius^{1*}, A. Obradors², G. Daina¹, L. Ramos¹, A. Pujol², R. Vidal², M. Oliver³, J. Benet^{1,4} y J. Navarro^{1,4*}

¹Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Facultat de Medicina, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra.

²Clínica Eugin, 08029, Barcelona.

³Hospital Universitari Son Dureta, 07014, Palma de Mallorca.

⁴Càtedra de Recerca Eugin-UAB.

e-mail: *Mariona.Rius@uab.cat; Joaquina.Navarro@uab.cat

INTRODUCCIÓN

Los portadores de translocaciones presentan un elevado riesgo de infertilidad, de aborto o de tener descendencia con alteraciones físicas y/o psíquicas debido a la producción de gametos desequilibrados. Con el fin de seleccionar embriones normales o equilibrados para la transferencia al útero materno, habitualmente se aplica el diagnóstico genético preimplantacional (PGD) mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) con sondas específicas para los cromosomas implicados en la translocación. Aún así, según la última recopilación de datos de la *European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) PGD Consortium* la tasa de implantación de los embriones transferidos es del 17% en portadores de translocaciones Robertsonianas y del 14% en portadores de translocaciones recíprocas.

Además de alteraciones cromosómicas directamente relacionadas con el tipo de segregación, se ha postulado que la conformación del trivalente o del cuadrivalente formado en la meiosis I para conseguir el apareamiento de los cromosomas translocados y de sus homólogos podría tener una influencia en la sinapsis y la disyunción del resto de bivalentes, que causaría otras aneuploidías. Partiendo de esta base y con el objetivo de detectar también posibles errores cromosómicos postzigóticos, el cribado de aneuploidías simultáneo al PGD para la translocación sería recomendable.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo era llevar a cabo un PGD para un portador de dos

translocaciones en el que no solamente se estudiaran los cromosomas implicados en la reorganización, sino todo el complemento cromosómico. Para ello se aplicó la técnica de la CGH rápida, que permite analizar todos los cromosomas y en toda su longitud con un límite de resolución de 10-20Mb. Además, con este método se evita la criopreservación de los embriones biopsiados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron tres ciclos de fecundación *in vitro* (FIV) y PGD para un portador de dos translocaciones con cariotipo 45,XY,t(2;17)(q14.2;q23)/t(14;21)(q10;q10). En el primer ciclo, debido al reducido tamaño del fragmento 17q translocado, se utilizó tanto la FISH como la CGH rápida para el diagnóstico. Una vez comprobado que la CGH rápida era capaz de detectar desequilibrios que involucrasen dicho fragmento, en los dos ciclos posteriores se utilizó únicamente la CGH rápida.

RESULTADOS

Evaluando conjuntamente los tres ciclos de FIV-PGD, se biopsiaron 18 embriones en día+3 y se obtuvo diagnóstico de 16 de ellos. La segregación predominante de la t(2;17) fue la 2:2 alternante (46,7% de los embriones), seguida de la 3:1 (26,7% de los embriones), la 2:2 adyacente-1 (20% de los embriones) y, finalmente, de la 2:2 adyacente-2 (6,7% de los embriones). Para la t(14;21) la segregación 2:1 alternante fue más frecuente (62,5% de los embriones) que la 2:1 adyacente (37,5% de los

embriones). Aparte de desequilibrios cromosómicos relacionados con las reorganizaciones, se detectaron múltiples aneuploidías y alteraciones estructurales que afectaban a otros cromosomas. Teniendo en cuenta la segregación de las dos translocaciones y el resto de alteraciones, solamente un embrión en el tercer ciclo de FIV-PGD mostró perfiles de CGH rápida compatibles con un complemento cromosómico equilibrado; éste se transfirió al útero materno el día+4 y produjo un embarazo actualmente en curso, del que el diagnóstico prenatal ha confirmado el cariotipo equilibrado.

CONCLUSIONES

Implementada la CGH rápida desarrollada en nuestro grupo al PGD de una pareja cuyo varón es portador equilibrado de dos translocaciones, 45XY,t(2;17)(q14.2;q23)/t(14;21)(q10;q10), se ha conseguido detectar no sólo desequilibrios de los cromosomas involucrados en la reorganización, sino también del resto de cromosomas. El análisis mediante CGH rápida permitió la transferencia en fresco, el día+4, del único embrión diagnosticado como exento de desequilibrios cromosómicos. Por primera vez, se ha conseguido el embarazo en un caso tan complejo después de tres ciclos de PGD mediante CGH rápida.

AGRADECIMIENTOS

FIS-ISCI III (PI080012), *Grup de Suport a la Recerca, Generalitat de Catalunya* (2009SGR1107), *Càtedra de Recerca Eugin-UAB*, *Beca FPU del Ministerio de Educación y Ciencia* (AP2006-02211).

002: DESEQUILIBRIOS CROMOSÓMICOS EN ESPERMATOZOIDES DE INDIVIDUOS PORTADORES DE TRANSLOCACIONES RECÍPROCAS

A. Godo, F. Vidal, J. Blanco, E. Anton

Unidad de Biología Celular. Facultad de Biociencias. Universidad Autónoma de Barcelona. 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès)

e-mail: anna.gp10@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La frecuencia de portadores de translocaciones recíprocas en la población de individuos infértiles supera hasta seis veces la de la población general. Los portadores de translocaciones recíprocas presentan un riesgo genético reproductivo incrementado debido a la producción de gametos portadores de anomalías cromosómicas. Las anomalías se originan como consecuencia de las segregaciones adyacente I, II, 3:1 y 4:0 de los cromosomas reorganizados y a la presencia de efectos intercromosómicos (ICE), es decir, incrementos de anomalías numéricas de cromosomas no implicados en la reorganización.

La metodología de evaluación del riesgo genético en estos individuos consiste en analizar de forma independiente segregación e ICE. En consecuencia, las anomalías detectadas en estas dos aproximaciones de estudio no pueden relacionarse directamente.

OBJETIVO

Determinar si existe relación entre los diferentes modos de segregación del tetravalente y la producción de anomalías cromosómicas numéricas en espermatozoides de portadores de translocaciones recíprocas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron espermatozoides procedentes de tres individuos portadores de las siguientes translocaciones recíprocas: t(5;8)(q33;q13) (P1), t(8;14)(q22;q32) (P2) y t(9;19)(q10;p10) (P3). Las muestras

fueron seleccionadas por presentar en estudios previos un ICE positivo y un patrón de segregación estándar: Alternante (46.5% ± 6.5); adyacente I (33.6% ± 4.4); adyacente II (11.7% ± 6.9); 3:1 (6.8% ± 3.5) y 4:0 (0.6% ± 0.6).

Se desarrolló un protocolo de FISH secuencial que consistió en aplicar dos rondas de hibridación sobre los mismos espermatozoides: En la primera ronda se realizó el estudio de ICE mediante dos hibridaciones paralelas, utilizando una combinación de sondas centroméricas de los cromosomas X, Y, 18; y otra combinación de sondas específicas de *locus* 13 y 21. La localización de todos los espermatozoides portadores de aneuploidías y diploidías fue registrada mediante la captura de coordenadas para su posterior relocalización. La segunda ronda de hibridación permitió la valoración de la segregación de los cromosomas reorganizados. En este caso se utilizó una combinación de sondas específica para cada individuo que identificaba los cromosomas implicados de forma diferencial. Se valoró el patrón de segregación en dos poblaciones de espermatozoides: (a) recuento general de la muestra y (b) espermatozoides relocalizados previamente clasificados como aneuploides o diploides. Los resultados de las frecuencias estudiadas se analizaron mediante el test χ^2 , considerando un intervalo de confianza del 99%.

RESULTADOS

Se analizaron un total de 22550 (P1), 9373 (P2) y 22805 (P3) espermatozoides. El número de gametos detectados con anomalías numéricas fue 762, 329 y 401, respectivamente.

El análisis de segregación en las poblaciones de espermatozoides con anomalías numéricas mostró diferencias significativas respecto el recuento general de la muestra, en el cual predominó la segregación alternante seguida de la adyacente I. En los individuos P1 y P3, las segregaciones mayoritarias fueron la 4:0 (40.8%; 48.5%) y 3:1 (26.3%; 24.3%), seguidas de alternante (11.1%; 6.3%), adyacente I (9.9%; 5.5%) y adyacente II (2.8%; 4.74%). En el individuo P2 predominó la segregación 3:1 (39.2%), seguida de alternante (16.3%), adyacente I (13%), adyacente II (8%) y 4:0 (6.9%). En todos los individuos se detectó un importante porcentaje de productos de segregación con combinaciones de sondas no esperadas: 9.1% (P1), 16.6% (P2) y 10.5% (P3).

CONCLUSIONES

El fenómeno de ICE y las segregaciones desequilibradas 3:1 y 4:0 son sucesos dependientes, que están condicionados por las interacciones cromosómicas que se establecen durante el proceso meiótico (heterosinapsis) y la eficacia de los puntos de control. Como consecuencia, los portadores de translocaciones recíprocas producen espermatozoides que acumulan anomalías cromosómicas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado con los proyectos SAF2010-22241, SGR2009-282 y UAB CF-180034. Agradecemos a los centros I.B.Q. Flor de Maig (Barcelona) y CPC (Barcelona) el suministro de las muestras.

003: ANÁLISIS DE TODOS LOS CROMOSOMAS EN EMBRIONES PREIMPLANTACIONALES MEDIANTE ACGH.

M. Sandalinas, E. García-Guixé, A. Jiménez-Macedo, C. Giménez
REPROGENETICS, Barcelona
e-mail: pgdteam@reprogenetics.es

INTRODUCCIÓN

No todos los problemas de esterilidad y/o infertilidad son atribuibles a anomalías cromosómicas, pero, hay un elevado porcentaje de parejas con un riesgo identificado de generar embriones cromosómicamente anormales. La técnica habitual de detección de estos embriones anormales era hasta hace poco la FISH (hibridación *in situ* de fluorescencia) en la que se utilizaban sondas para los nueve cromosomas más implicados en abortos y embarazos a término afectos. La aparición reciente de la técnica de aCGH nos permite analizar todos los cromosomas en embriones de estas parejas con riesgo incrementado.

OBJETIVO

Estudiar la frecuencia de anomalías cromosómicas obtenida mediante la aplicación de aCGH para el análisis de todos los cromosomas en blastómeros de embriones humanos preimplantacionales provenientes de FIV-DGP.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realiza biopsia de una sola célula de embriones en día 3 de desarrollo *in vitro* de parejas que acuden a centros de reproducción asistida por diferentes indicaciones: abortos de repetición (RAB), edad materna avanzada (AMA), fallos repetidos de implantación (RIF) y factor masculino (MF).

Las biopsias se someten al proceso de amplificación total del genoma (WGA), marcaje fluorescente e hibridación sobre *arrays* de BAC. Posteriormente se procede al análisis de los perfiles obtenidos.

RESULTADOS

Entre Septiembre de 2009 y marzo de 2011, se han realizado un total de 54 ciclos de FIV-DGP para análisis de aneuploidía mediante el análisis de todos los cromosomas.

La edad media de las pacientes es de 37.7 (rango: 19-43a) con una media de embriones biopsiados por paciente de 6.02. Se ha obtenido resultado en el 94.5% de los embriones biopsiados (n=325) resultando el 33.7% normales para todos los cromosomas. Del 66.3% restantes, el 48.5% fueron aneuploides (1-3 aneuploidías), el 11.5% anormales complejos (4-11 aneuploidías) y el 6.3% restante correspondió a perfil caótico (más de 12 aneuploidías).

Dentro del grupo de los embriones aneuploides el porcentaje de monosomías observado fue del 57,4% mientras que el de trisomías fue del 42,6%. Todos los cromosomas estaban implicados en eventos aneuploides pero la frecuencia de aneuploidía observada no fue la misma para todos ellos: los cromosomas principalmente involucrados en aneuploidías fueron los cromosomas 22 (8.6%), 16 (8.1%), 21 (7.9%),

19 (7.1%) y 15 (6.1%), mientras que los cromosomas con menor frecuencia de aneuploidía fueron el 8 (1.7%), 1 (2.2%) y el cromosoma 6 (2.2%). Del total de aneuploidías diagnosticadas, el 48,3% implicaba a cromosomas no estudiados en el test de 9 aneuploidías y la aplicación de la aCGH permitió detectar un 24,1% de embriones aneuploides (de entre 1 y hasta 6 aneuploidías) que se hubiesen diagnosticado como normales y probablemente transferido mediante el test de 9 sondas.

CONCLUSIONES

Mediante aCGH ha sido posible detectar un 48,3% más de aneuploidía y un 24,1% más de embriones aneuploides que mediante la FISH de 9 cromosomas. Estos resultados representan, por un lado, una mejora en las herramientas diagnósticas al evitar la transferencia de embriones que por otros métodos hubieran sido diagnosticados como normales y, del otro, observar qué cromosomas presentan aneuploidía con mayor o menor frecuencia. Esperamos, a medida que vayamos ampliando la serie, poder detectar si los cromosomas implicados varían según el tipo de indicación, puesto que los mecanismos de origen de aneuploidía son diferentes según la indicación.

Los *arrays* de CGH permiten analizar todos los cromosomas en biopsias embrionarias con elevada eficiencia y fiabilidad.

004: CORRELACIÓN ENTRE LOS VALORES DE REFERENCIA DEL MANUAL DE LA OMS DEL 2010 Y EL ESTUDIO DE ANEUPLOIDÍAS ESPERMÁTICAS MEDIANTE HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH) EN PACIENTES ESTÉRILES CON CARIOTIPO NORMAL.

F. Marina, R. Alcolea, M. Rafael, M. Domínguez, L. Jiménez, A. Hernández, S. Marina.
CENTRO: Instituto de Reproducción CEFER. ANACER
e-mail: info@institutocefer.com

INTRODUCCIÓN

Diferentes estudios han correlacionado los parámetros seminales con la incidencia de aneuploidías espermáticas. En este estudio pretendemos hacer una actualización de la incidencia de los estudios de FISH espermáticos alterados según los nuevos parámetros de referencia de la OMS (2010).

MATERIAL Y MÉTODO

Realizamos el estudio de FISH espermático en 1693 pacientes con cariotipo normal que acudieron a nuestro centro con deseo gestacional. Los espermatozoides se fijaron con Carnoy y posteriormente se descondensaron las

cabezas con DTT (dithiotreitol). Se utilizó el kit Vysis® Aneuvision compuesto por tres sondas centroméricas (para los cromosomas 18, X e Y) y dos específicas de *loci* (para los cromosomas 13 y 21). Se estudiaron un mínimo de 1.000 espermatozoides para cada grupo de sondas siempre que la calidad de la muestra seminal lo permitiera. Para el grupo control se estudiaron 10 donantes con fertilidad probada en los que se contaron 10.000 espermatozoides para cada grupo de sondas.

RESULTADOS

En las siguientes tablas se muestran los porcentajes de pacientes con FISH alterados según los percentiles de recuento total, movilidad progresiva

y morfología normal publicados en el manual de la OMS del 2010.

CONCLUSIONES

Existe una relación muy clara entre los parámetros estudiados y la incidencia de alteraciones en el FISH, especialmente en el caso del recuento espermático total. Esto apunta a que los mecanismos que originan las no disyunciones durante el proceso meiótico tienen un efecto directo sobre el recuento espermático. Este efecto puede ser detectado con el estudio de FISH en espermatozoides. Estos resultados pueden ayudar al clínico a decidir en qué casos solicitar el estudio de FISH y qué probabilidad de encontrar anomalías hay en cada caso.

Parámetros (unidades)	N	Percentil								
		2.5	5	10	25	50	75	90	95	97.5
Número total de espermatozoides (10 ⁶ por eyaculado)	1859	23	39	69	142	255	422	647	802	928
FISH alterado (%)	1693	28,0	17,5	17,0	12,0	7,0	7,1	5,8	3,6	0

Parámetros (unidades)	N	Percentil								
		2.5	5	10	25	50	75	90	95	97.5
Movilidad progresiva (%)	1780	28	32	39	47	55	62	69	72	75
FISH alterado (%)	1693	25	15,9	12,1	11,6	10,4	7,1	11,5	0	0

Parámetros (unidades)	N	Percentil								
		2.5	5	10	25	50	75	90	95	97.5
Morfología normal (%)	1851	3	4	5.5	9	15	24.5	36	44	48
FISH alterado (%)	1693	26,9	25	20	11,8	15,2	8,7	5,3	10,9	3,4

005: FISH EN ESPERMATOZOIDES: ¿CUÁNTOS CROMOSOMAS DEBEMOS ANALIZAR?

E. García-Mengual, R. Claramunt, C. Sánchez-Matamoros, S. Tomás, M. Pardo, R. Bautista-Llácer, T. Alberola, X. Vendrell
Sistemas Genómicos
e-mail: elena.garcia@sistemasgenomicos.com

INTRODUCCIÓN

La aparición de las técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) ha permitido ampliar el estudio del gameto masculino a lo largo de todo el proceso espermatogénico. Actualmente, la mayoría de los protocolos de estudio del varón infértil/subfértil incorporan estudios citogenéticos que resultan de gran ayuda para el asesoramiento genético reproductivo. Los estudios publicados presentan gran variabilidad. No obstante, han demostrado una asociación entre alteraciones del seminograma, fallos previos de FIV y/o abortos de repetición, y el incremento de aneuploidías en espermatozoides de individuos con cariotipo somático normal. En este contexto, está indicado el estudio de las aneuploidías espermáticas en varones pertenecientes a alguno de estos grupos de riesgo. Pero, ¿cuántos y qué cromosomas debemos analizar?

La mayoría de los centros que han incorporado la técnica, basan sus resultados en el análisis de nulismías, y disomías para 5 cromosomas (13, 18, 21, X e Y). Sin embargo el rastreo de aneuploidías en embriones procedentes de FIV (PGS) revela una elevada incidencia de aneuploidías para los cromosomas 15, 16, 17 y 22, lo que justificaría la incorporación de estos cromosomas al análisis espermático ampliándolo hasta 9 cromosomas.

OBJETIVOS

Comparar la capacidad de diagnóstico de la FISH en espermatozoides en función del número de cromosomas analizados, observando la incidencia de aneuploidías (disomías y nulismías) en la misma población, estudiada de forma simultánea; una fracción de la muestra se hibrida con sondas específicas para 5 cromosomas (13, 18, 21, X e Y) y otra con sondas para 4 cromosomas adicionales (15, 16, 17 y 22).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 174 muestras de eyaculado de varones infértiles con diversa etiología (O, OA, OAT, fallo de FIV, y/o abortos de repetición). El procesamiento de la muestra incluye: lavado, permeabilización, fijación, extensión, e hibridación *in situ* fluorescente con sondas centroméricas para los cromosomas 15, 16, 17, 18, X, Y (Vysis®) y sondas *locus* específicas para los cromosomas 13, 21 y 22 (Vysis®). El análisis de las señales de hibridación se realizó mediante un sistema fluorescente automatizado basado en la digitalización de las imágenes mediante un algoritmo estadístico (sistema Metafer-MetaCyte® de MetaSystems®). Se estudiaron unos 1.200 espermatozoides por cromosoma/sonda y unos 11.000 por muestra, resultando un total de 1.809.912 espermatozoides analizados. Para el análisis estadístico se aplicó el test de Chi-cuadrado.

RESULTADOS

El estudio simultáneo de las dos series de hibridación mostró que el 35.6% (62/174) de los casos presentaban alteraciones en alguno de los 9 cromosomas analizados. El análisis reveló un 8.6% (15/174) y un 21.8% (38/174) de muestras aneuploides, en la serie de 5 (13, 18, 21, X, Y) y 4 (15, 16, 17, 22) cromosomas respectivamente ($P < 0.05$). Un 5.2% (9/174) de los pacientes presentó aneuploidías en más de un cromosoma en ambas series. El 61.3% de los casos patológicos (38/62) mostraron alteración únicamente en la serie de 4 cromosomas (15, 16, 17, 22). Las tasas de aneuploidías detectadas por cromosoma analizado son: 0.57% (1/174) para el cromosoma 13; 1.15% (2/174) para el 18; 1.72% (3/174) para el 21; 10.92% (19/174) para X e Y; 7.47% (13/174) para el 15; 1.72% (3/174) para el 16; 4.02% (7/174) para el 17 y 14.94% (26/174) para el 22.

CONCLUSIONES

El estudio de los cromosomas 15, 16, 17 y 22 en espermatozoides de varones procedentes de parejas con problemas de fertilidad revela tasas elevadas de aneuploidías no detectadas en el estudio básico de 5 cromosomas. El análisis automatizado de 9 cromosomas resulta rápido, coste-efectivo, y reduce la subjetividad inter e intraobservador, convirtiéndolo en una estrategia especialmente útil para el asesoramiento genético reproductivo.

006: HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA: RESULTADOS PRELIMINARES

D. Tuñón^{1*}, M. Parriego¹, M. Boada¹, T. Alberola², J. Navarro³, V. Coroleu¹ y A. Veiga^{1,4}.

¹ Servicio de Medicina de la Reproducción. Departamento de Obstetricia, Ginecología y Reproducción. Institut Universitari Dexeus.

² Unidad de Genética Reproductiva. Sistemas Genómicos, S.L. Ronda G. Marconi, 6. 46980 Paterna, Valencia.

³ Unidad de Biología Celular y Genética Médica. Facultad de Medicina. UAB. Plaça Cívica. 08193 Bellaterra.

⁴ Unidad Banco de Líneas Celulares. Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona. Dr Aiguader, 88. 08003 Barcelona.

e-mail: doltun@dexeus.com

INTRODUCCIÓN

La selección embrionaria mediante cribaje de aneuploidías (PGS) en parejas con cariotipos normales para la mejora de los resultados de Fecundación in Vitro (FIV) es una técnica de aplicación controvertida. Aunque la hipótesis parece razonable, los estudios prospectivos randomizados realizados hasta el momento no han mostrado una mejora en la tasa de niño vivo nacido en casa mediante su uso respecto a los ciclos realizados con selección morfológica.

Uno de los factores que parece más limitante es el uso de la técnica de Hibridación *In Situ* Fluorescente (FISH) que limita a un máximo de 9 los cromosomas que pueden analizarse. Mejoras en los protocolos de Hibridación Genómica Comparada (CGH) han permitido que esta técnica pueda aplicarse en células únicas embrionarias y tener un resultado cromosómico completo en 48 horas, permitiendo la transferencia en el ciclo en fresco.

OBJETIVO

Evaluar los resultados obtenidos en los ciclos de PGS-CGH. Se pretende analizar el porcentaje de embriones normales, anormales, sin diagnóstico y el de ciclos sin transferencia. Asimismo se determinará el porcentaje de embriones anormales que no hubieran sido detectados mediante un PGS-FISH para 9 cromosomas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo de los ciclos de PGS-CGH realizados entre mayo de 2010 y marzo de 2011. Las indicaciones para someterse a un ciclo de FIV con CGH fueron: fallo repetido de FIV (n=4), presencia de un factor masculino de origen genético (n=4) y abortos de repetición de causa desconocida (n=3).

En el tercer día de desarrollo in Vitro se biopsió una única célula de los embriones con buenas características morfológicas. Los blastómeros fueron procesados para *array*-CGH (n=9) o metaphase-CGH (n=2). La transferencia de los embriones diagnosticados como normales se realizó en el quinto día de desarrollo.

Los embriones diagnosticados como anormales fueron clasificados en dos grupos: aneuploides simples o aneuploides complejos. Éste último grupo está constituido por aquellos embriones en los que se observaron anomalías numéricas para al menos tres cromosomas.

RESULTADOS

Durante el periodo analizado se han realizado 11 ciclos de PGS-CGH. La media de edad de las pacientes fue de 36.1 (rango 32-41).

Se analizaron un total de 74 embriones (X=6.7 embriones/paciente). Dieciséis de los 74 (21.6%) fueron diagnosticados como normales, 54 (73%) como anormales y no se obtuvo diagnóstico de

cuatro blastómeros 5.4 %.

El 53.7% de los embriones caracterizados como anormales (29/54) presentaban aneuploidías simples mientras que el 46.3% (25/74) mostraban aneuploidías numéricas complejas.

En 26 de los 54 embriones anormales (35.1%) se detectaron alteraciones que afectaban a cromosomas o regiones que no habrían sido analizadas mediante PGS-FISH. Consecuentemente, estos embriones hubieran sido considerados como transferibles aplicando FISH como técnica diagnóstica, pudiendo dar lugar a fallos de implantación o bien a abortos precoces.

En dos pacientes (18.2%) no fue posible realizar la transferencia embrionaria al no disponer de embriones euploides. Se transfirieron una media de 1.3 embriones por paciente, alcanzándose una tasa de embarazo por ciclo del 36.4%, por transferencia del 44.4% y una tasa de implantación del 33.3%. En todos los casos se trata de gestaciones únicas. De los 4 embarazos alcanzados, 1 ha sido parto a término y 3 siguen en curso.

CONCLUSIONES

La CGH nos ha permitido detectar un 35.1% más de embriones aneuploides respecto a la FISH para 9 cromosomas. Aunque los resultados son preliminares, la determinación de la dotación cromosómica completa de los embriones parece una mejor aproximación para los casos de FIV-PGS.

007: EFECTO INTERCROMOSÓMICO: ESTUDIO DE ANEUPLOIDÍAS EN ESPERMATOZOIDES DE PORTADORES DE REORGANIZACIONES CROMOSÓMICAS.

E. García-Guixé, A.R. Jiménez-Macedo, C. Giménez, M. Sandalinas
 Reprogenetics, Barcelona.
 e-mail: pgdteam@reprogenetics.es

INTRODUCCIÓN

Los pacientes portadores de reorganizaciones cromosómicas presentan dos riesgos genéticos para la descendencia: por la formación de gametos desequilibrados debido a la propia reorganización y por aneuploidías debidas al efecto intercromosómico (EIC). Los cromosomas implicados en reorganizaciones muestran frecuentemente regiones asinápticas durante la meiosis I, pudiendo interferir en la segregación de otros cromosomas (fenómeno conocido como EIC).

OBJETIVOS

Estudiar el posible EIC en hombres portadores de reorganizaciones cromosómicas mediante el Diagnóstico Genético en Espermatozoides (DGE), que consiste en la aplicación de la técnica de FISH (Hibridación *in situ* de fluorescencia) para detección de anomalías cromosómicas en espermatozoides.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se procesaron 22 muestras de pacientes con reorganizaciones cromosómicas (7 portadores de translocaciones recíprocas, 8 de translocaciones robertsonianas y 7 de inversiones peri y paracéntricas).

Las muestras fueron fijadas en metanol:ácido acético (3:1) y se realizaron extensiones sobre portaobjetos.

La descondensación de los núcleos espermáticos y la desnaturalización de la cromatina se llevaron a cabo siguiendo protocolos estandarizados. Se aplicaron sondas de FISH para un máximo de 9 cromosomas (XY 13 14 15 18 20 21 22) no implicados en la reorganización cromosómica. Para cada paciente se determinó la frecuencia de disomías y diploidías y los resultados se compararon con una población control (10 donantes de semen con cariotipo normal, normozoospermicos y de fertilidad probada).

RESULTADOS

Se observó un aumento significativo de anomalías cromosómicas en los espermatozoides del 59% de los individuos estudiados (13 de 22). En función del tipo de reorganización el porcentaje de pacientes con DGE alterado obtenido varía: el 29% de los pacientes portadores de inversiones, el 57% de los portadores de translocaciones recíprocas, y el 87% de los portadores de translocaciones robertsonianas presentan un incremento significativo de anomalías

en cromosomas no implicados en la reorganización. Las anomalías más frecuentemente encontradas fueron disomías de los cromosomas sexuales y del cromosoma 21. En solamente 1 caso se observó un porcentaje incrementado de espermatozoides diploides (individuo portador de una translocación robertsoniana).

CONCLUSIONES

Se observa efecto intercromosómico en un 59% de los pacientes portadores de reorganizaciones. Así pues, el riesgo reproductivo de aneuploidía en estos pacientes se añade al riesgo de generar embriones desequilibrados. El riesgo añadido de aneuploidía varía en función del tipo de reorganización. El grupo de pacientes más afectados son los portadores de translocaciones robertsonianas, seguido de los portadores de recíprocas y finalmente las inversiones. Se aconseja realizar un estudio de aneuploidías en espermatozoides previo al ciclo de FIV-DGP-Reorganizaciones para poder determinar si el individuo portador de reorganización cromosómica tiene, además, riesgo de aneuploidía. El DGE es una herramienta eficaz para el estudio del efecto intercromosómico, permitiendo realizar un asesoramiento genético reproductivo más completo.

008: LA PRESENCIA DE BMN NO ES DETERMINANTE PARA DESCARTAR UN EMBRIÓN COMO CROMOSÓMICAMENTE ANORMAL

M. Riqueros, J.M. Molina, M. Bellés, A. Ballesteros, G. Calderón
 IVI Barcelona
 e-mail: amaia.mugica@ivi.es

INTRODUCCIÓN

La multinucleación (MN) ha sido

ampliamente estudiada pero poco se sabe de su origen y consecuencias. Son muchos los que sugieren que los embriones con

blastómeras multinucleadas (BMN) han de ser descartados. Sin embargo, el nacimiento de niños procedentes de

embriones multinucleados indica que no todos los embriones con BMN han de ser descartados.

Debido a que las BMN frecuentemente presentan una constitución cromosómica diferente a la de sus blastómeras hermanas mononucleadas, se sabe que las BMN no son aptas para realizar el diagnóstico genético preimplantacional (DGP).

OBJETIVOS

Los objetivos del estudio contemplan (1) determinar si los embriones con BMN presentan un mayor índice de anomalía cromosómica y (2) hacer un seguimiento de los embarazos obtenidos a partir de la transferencia de embriones normales con BMN.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo de 432 ciclos (2693 embriones) de DGP realizados entre 2004 y 2010 en IVI Barcelona. La indicación para el DGP de los casos incluidos en el estudio fue el fallo de implantación, aborto de repetición, edad y factor masculino severo (FISH anormal de espermatozoides y meiosis alterada).

La morfología embrionaria fue descrita en D+2 (44-47 horas post inseminación/inyección) y en D+3 (67-71 horas post inseminación/inyección) siguiendo los criterios de ASEBIR. La biopsia embrionaria se realizó en D+3 siempre y cuando el embrión presentara un mínimo de 6 células y menos de un 20% de fragmentación. El estudio de aneuploidías para los cromosomas 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X e Y se llevó a cabo en una única célula mononucleada. Las transferencias embrionarias se

	Tasa de anomalía	p-valor
MN D2 (%)	328/415 (79,03)	
No MN D2 (%)	1489/2278 (65,36)	p<0,05
MN D3 (%)	303/403 (75,19)	
No MN D3 (%)	1514/2290 (66,11)	p<0,05

Tabla 1. Correlación entre MN y anomalía

	Gestación		
	No	Si	
	224 (51,85)	208 (48,15)	
	Aborto		
	Si	No	
	43 (20,67)	165 (69,33)	
Media de ET± SD	1,46 ^a ±0,52	1,81 ^b ±0,59	1,91 ^b ±0,65
Nº embr MN D2 T/nº de embr T %	13,17 ^a	5,66 ^b	8,14 ^b
Nº embr MN D3 T/nº de embr T %	11,53 ^a	9,76 ^a	13,57 ^a

Tabla 2. Correlación entre MN y gestación/aborto

realizaron en D+5 según el resultado de la FISH y las características morfológicas.

Los resultados se analizaron con el test de χ^2 y la U de Mann-Whitney.

RESULTADOS

La tasa de anomalía cromosómica es significativamente superior en los embriones con BMN (tabla 1).

El embarazo clínico se consiguió en un 48,15% de los casos y de éstos, el 69,33% finalizan en embarazo a término. La tabla 2 muestra el porcentaje de embriones MN transferidos en los grupos de no gestación, aborto y gestación a término.

CONCLUSIONES

La mera presencia de MN en una blastómera no es indicativa de una

dotación cromosómica anormal en el resto del embrión. Sin embargo, los embriones con BMN presentan un índice de anomalía significativamente superior respecto a aquellos que no las presentan. Además, la transferencia de embriones con BMN y con una dotación cromosómica normal para los cromosomas analizados da lugar a embarazos a término. Cuando la MN aparece en día 2 del desarrollo, a pesar de que los embriones sean cromosómicamente normales tienen un poder implantatorio menor, pero cuando la MN aparece en día 3 parece no afectar a la implantación. El hecho de que embriones MN con dotación cromosómica normal de lugar a embarazos a término indica que no todos los embriones MN han de ser descartados como anormales ya que o bien el embrión es capaz de aislar esa blastómera de la masa celular interna o bien no siempre las BMN tienen una dotación cromosómica anormal.

009: CIGOTOS MONOPRNUCLEARES DE ICSI: DESARROLLO EMBRIONARIO Y CONSTITUCIÓN CROMOSÓMICA

S. Mateo¹, M. Parriego¹, M. Boada¹, F. Vidal², A. Veiga^{1,3}

¹Instituto Universitario Dexeus, Servicio de Medicina de la Reproducción

²Universidad Autónoma de Barcelona

³Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona

e-mail: silmat@dexeus.com

INTRODUCCIÓN

La observación de un único pronúcleo y dos corpúsculos polares a las 18+2h posteriores a la microinyección intracitoplasmática (ICSI) se considera un patrón anómalo de fecundación en la especie humana. Se postulan tres mecanismos como posibles causas del origen de estos cigotos: la asincronía de la formación/desmantelamiento de los pronúcleos, la singamia y la activación partenogenética del ovocito. Datos procedentes de estudios previos describen bajos porcentajes de euploidía en los embriones derivados de estos cigotos aunque existen grandes variaciones entre estudios.

OBJETIVO

Se estudio la constitución cromosómica de los embriones derivados de cigotos con estas características y se buscaron relaciones entre la dotación cromosómica y la capacidad de alcanzar el estadio de blastocisto con el fin de valorar su posible uso en tratamientos de reproducción humana asistida.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron 58 cigotos monopronucleares de ICSI que provenían de 84 ciclos del programa

de fecundación in vitro (FIV). Los embriones se mantuvieron en cultivo hasta un máximo de 7 días a 37°C, 6% de CO₂ y 95% de humedad. Se fijaron en el momento en que se observó el bloqueo de la división embrionaria o cuando habían alcanzado el estadio de blastocisto. Se procesaron para FISH utilizando sondas comerciales específicas para los cromosomas 13, 18, 21, X e Y (MultiVysion PGT Multicolor Probe, Vysis®, AbbotMolecular). Los embriones se clasificaron según los criterios propuestos por Delhanty et al. (1997) ligeramente modificados: embriones normales ($\geq 90\%$ núcleos cromosómicamente normales), embriones anormales ($< 90\%$ núcleos cromosómicamente normales). Entre los embriones anormales se distinguió entre: no mosaicos ($\geq 90\%$ núcleos con la misma anomalía), mosaicos ($\geq 50\%$ núcleos con la misma anomalía) y caóticos ($< 50\%$ núcleos con la misma anomalía). Los embriones con menos de 8 núcleos analizables no fueron incluidos en el estudio de la constitución cromosómica debido a la limitada información que podían proporcionar.

RESULTADOS

Se obtuvo diagnóstico de un mínimo de 8 núcleos en 25 embriones (43,1%), con un total de 761 núcleos

analizados (media 30,4; rango: 8-133). Todos los embriones fueron cromosómicamente anormales presentando más de una línea celular: 9 mosaicos (36%) y 16 caóticos (64%). Diecinueve embriones (76%) presentaron células diploides en porcentajes variables (6-83%). Se observó presencia del cromosoma Y en 10 embriones (40%). Solo un 5% de los cigotos formó un blastocisto de buena morfología. El estudio del desarrollo embrionario en relación a la constitución cromosómica mostró que los embriones mosaicos llegaron al estadio de blastocisto en mayor proporción que los embriones caóticos.

CONCLUSIONES

El estudio cromosómico demostró que el 40% de los embriones procedentes de cigotos 1PN de ICSI presentaron una señal perteneciente al cromosoma Y, lo que parece indicar que el origen de estos cigotos no fue la activación partenogenética sino la fecundación por parte de un espermatozoide. Todos los embriones procedentes de cigotos monopronucleares tras ICSI de nuestro estudio han sido diagnosticados como cromosómicamente anormales por lo que, independientemente de su morfología, se desaconseja su uso con finalidades reproductivas.

010: PRIMERA APLICACIÓN DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL DE DOBLE FACTOR PARA SÍNDROME DE LYNCH O CÁNCER COLORECTAL HEREDITARIO NO POLIPÓSICO (CCHNP)

L. Ramos*¹, G. Daina*^{1,2}, M. Rius^{1,2}, A. Polo³, J. Benet¹, O. Martínez-Pasarell³, A. Obradors^{2,4}, J. Navarro¹

*Los dos primeros autores han contribuido de la misma forma en este trabajo.

¹Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Facultat de Medicina, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra.

²Càtedra de Recerca Eugèn-UAB.

³Fundació Puigvert-Hospital de Sant Pau i de la Santa Creu, 08025, Barcelona.

⁴Clínica Eugèn, 08029, Barcelona.

e-mail: MariaEulalia.Ramos@uab.cat, Gemma.Daina@uab.cat, Joaquina.Navarro@uab.cat

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades más ampliamente indicadas para el Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) son aquellas con una elevada penetrancia y una aparición temprana en la infancia. Hoy en día, aunque no exento de debate, el DGP para síndromes de predisposición a cáncer ya es una realidad, habiéndose descrito DGPs para poliposis adenomatosa familiar (FAP) y cáncer de mama y ovario causados por mutaciones en los genes BRCA1 y 2.

Según la *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE), sólo el 15% de los embriones transferidos después de un DGP dan lugar a embarazo. Se cree que una de las razones de esta baja tasa de implantación es la presencia de aneuploidías en los embriones transferidos. A pesar de ello, no se suelen analizar las aneuploidías en los casos de DGP para enfermedades monogénicas.

Recientemente se ha propuesto la realización de un DGP de doble factor (DF-DGP) en el que se realiza el estudio de mutaciones en un blastómero del embrión y el análisis del complemento cromosómico en otro blastómero, mediante la Hibridación Genómica Comparada (CGH) rápida desarrollada en nuestro grupo. El DF-DGP permite seleccionar para su transferencia dentro del mismo ciclo de FIV, los embriones libres de la enfermedad monogénica y euploides, que tendrán una mayor probabilidad de implantación.

OBJETIVOS

Conseguir un embarazo libre de Síndrome de Lynch o Cáncer Colorectal Hereditario No Polipósico (CCHNP) en una familia de riesgo mediante un DF-DGP, una vez autorizado por la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida.

MATERIAL Y MÉTODOS

Una pareja con el cónyuge masculino afectado de Síndrome de Lynch, portador de la mutación p.Lys616del en el gen MLH1, fue incluida en un programa de DF-DGP en colaboración con la Fundació Puigvert-Hospital de Sant Pau i de la Santa Creu de Barcelona.

Se diseñaron los cebadores para la detección directa e indirecta de la mutación, mediante seis *Short Tandem Repeats* (STRs) cercanos al gen MLH1.

Se realizaron dos ciclos de FIV. En el primero, tras la inducción hormonal ovocitaria se obtuvieron 7 ovocitos maduros que se inseminaron mediante ICSI, de los cuales 4 se fecundaron y fueron congelados en estadio 2PN. En el segundo ciclo, de 14 ovocitos maduros inseminados, 12 se fecundaron y 11 resultaron evolutivos a día+3. Tres de los embriones congelados en el primer ciclo sobrevivieron a la descongelación.

Se biopsiaron dos blastómeros de un total de 14 embriones. Uno de los blastómeros fue sometido a una amplificación del genoma mediante

la *Multiple Displacement Amplification* modificada y posteriormente se amplificaron los fragmentos de interés por PCR multiplex. Cada PCR se leyó por electroforesis capilar en un secuenciador ABIPrism 3730 (Applied Biosystems). El segundo blastómero biopsiado se utilizó para el análisis citogenético siguiendo el protocolo de CGH rápida según Rius et al., 2010.

RESULTADOS

En 12 de los 14 embriones biopsiados (85,7%) se consiguió el diagnóstico monogénico: 7 de ellos eran heterocigotos afectados para el Síndrome de Lynch (58,3%), mientras que 5 eran homocigotos sanos (41,6%). Los 14 embriones biopsiados fueron diagnosticados citogenéticamente (100%): 8 eran euploides (57,1%) y 6 presentaban alteraciones (42,9%).

Dos embriones evolutivos, que eran tanto libres de la mutación como euploides, se transfirieron en día+5 y han dado lugar a un embarazo en curso.

CONCLUSIONES

Se ha conseguido por primera vez un embarazo libre de Síndrome de Lynch o Cáncer Colorectal Hereditario No Polipósico (CCHNP) consecuencia de un diagnóstico genético preimplantacional de doble factor. Se ha puesto en evidencia la utilidad del DF-DGP, que puede representar una mejora en la tasa de implantación del DGP para enfermedades monogénicas.

011: DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL DE TRANSLOCACIONES MEDIANTE ACGH. RESULTADOS PRELIMINARES.

C. Giménez, E. Garcia-Guixé, A. Jiménez-Macedo, M. Sandalinas
Reprogenetics, Barcelona
e-mail: litus@reprogenetics.es

INTRODUCCIÓN

Las parejas portadoras de translocaciones tienen un elevado riesgo de producir gametos con desequilibrios cromosómicos que pueden dar lugar a embriones no viables, abortos o descendencia afecta. El DGP de translocaciones mediante FISH ha permitido disminuir hasta un 10% el riesgo de aborto en parejas portadoras. No obstante, sabemos que, por un lado, con la edad materna aumenta el riesgo de aneuploidías para otros cromosomas que pueden no estar involucrados en la translocación y, del otro, independientemente de la edad de la paciente, el efecto inter cromosómico puede dar lugar a anomalías numéricas en otros cromosomas no implicados en la anomalía estructural.

Para evitar la transferencia de embriones normales/equilibrados para la translocación pero portadores de aneuploidías se pueden analizar otros cromosomas mediante FISH, pero esta técnica únicamente permite analizar unos pocos cromosomas más, simultáneamente con la translocación. La aparición de la aCGH permite el análisis de todos los cromosomas junto con aquellos implicados en la translocación, siempre que los fragmentos translocados tengan un tamaño superior a 6Mb. Para tamaños inferiores, la técnica aún no ha sido validada.

OBJETIVOS

Analizar si los aCGH permiten observar más embriones cromosómicamente

anormales que con la técnica de FISH convencional.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron embriones obtenidos de parejas portadoras de translocaciones mediante la técnica de FIV o FIV-ICSI a los que se les biopsió una única célula en D+3 de desarrollo embrionario. Las células biopsiadas fueron introducidas en un tubo de PCR donde fueron sometidas al proceso de amplificación total del genoma (WGA). Posteriormente se procedió al marcaje fluorescente e hibridación sobre *arrays* de BAC (24Sure, BlueGnome, Cambridge, UK). Los *arrays* fueron leídos en un escáner y los perfiles obtenidos analizados mediante software específico. La transferencia de los embriones normales/equilibrados y euploides se realizó en día +5.

RESULTADOS

Entre Julio de 2010 y Marzo de 2011, se realizaron un total de 5 ciclos de FIV-DGP para análisis de translocación más aneuploidía mediante aCGH, correspondientes a 3 y 2 pacientes portadores de translocaciones recíprocas y robertsonianas, respectivamente.

La edad media de las pacientes fue de 34a (rango: 29-37a) con una media de embriones biopsiados por paciente de 4,4 (rango: 3-6). Se ha obtenido resultado en todos los embriones biopsiados (n=22).

De los 22 embriones analizados, 2 (9.1%) resultaron ser normales o equilibrados, 3 (13.6%) fueron normales o equilibrados pero presentaban, además, aneuploidía, 3 (13.6%) resultaron desequilibrados, 10 (45.5%) eran desequilibrados y además presentaban aneuploidía y los 4 (18.2%) últimos fueron caóticos.

La utilización del aCGH permitió detectar entre los embriones que presentaban aneuploidía, un 38.5% más que si se hubiera utilizado una FISH adicional de 9 cromosomas (XY, 13, 15, 16, 17, 18, 21 y 22).

Si definimos el término conversión como el porcentaje de embriones normales o equilibrados que pasan a ser no transferibles por la presencia de aneuploidía detectada mediante aCGH, ésta fue del 66% (2 de 3).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran que los aCGH pueden ser utilizados para el análisis de translocaciones, lo que permite, además, el análisis simultáneo de todos los cromosomas. De los 22 embriones analizados, 13 presentaban anomalías numéricas y, de éstos, 5 hubieran pasado desapercibidos si no se hubieran analizado todos los cromosomas. Existe un elevado grado de aneuploidía en pacientes portadores de translocaciones, por lo que es recomendable analizar, además de aquellos cromosomas implicados en la anomalía estructural, el resto de los cromosomas.

012: DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL EN VARONES CON MEIOSIS ALTERADA. RESULTADOS SEGÚN LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO DE FISH EN ESPERMATOZOIDES

M. Esbert, F. Vidal, M. Florensa, M. Riqueros, A. Ballesteros, G. Calderón
IVI-Barcelona
e-mail: margu.esbert@ivi.es

INTRODUCCIÓN

La alteración en el proceso de la meiosis puede originar aneuploidías en los espermatozoides. Dichas alteraciones pueden ser observadas indirectamente mediante la técnica de FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) en espermatozoides, o directamente mediante el estudio de las figuras meióticas obtenidas a partir del tejido testicular.

El estudio de la meiosis en tejido testicular tiene como inconvenientes en primer lugar que la obtención de tejido testicular requiere una biopsia, a la que no todos los pacientes están dispuestos y además el diagnóstico no siempre es claro ni concluyente. Por otro lado, la FISH en espermatozoides eyaculados suele dirigirse a valorar las anomalías de 5 cromosomas (13,18,21,X,Y).

El porcentaje de embriones anormales derivados de pacientes que han presentado alteraciones meióticas o anomalías en el estudio de FISH en espermatozoides es superior a los derivados de pacientes con resultados meióticos y de FISH en espermatozoides normales. No obstante aun queda por demostrar cual de las dos herramientas

puede reflejar con mejor fidelidad la correlación con las aneuploidías presentes en los embriones.

OBJETIVOS

Los objetivos de nuestro estudio fueron: 1) analizar la correlación existente entre ambas pruebas diagnósticas; 2) comparar el porcentaje de embriones aneuploides presente en ambos grupos; 3) comparar los resultados clínicos de ambos grupos de estudio tras un ciclo de FIV con DGP (Diagnóstico Genético Preimplantacional).

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio incluyó 48 pacientes cuyo estudio meiótico resultó anormal y a los que también se les solicitó un estudio de FISH en espermatozoides. Los pacientes se sometieron a 57 ciclos de FIV con DGP.

La población se dividió en dos grupos de estudio en función del resultado del FISH en espermatozoides. La biopsia embrionaria se realizó en día 3 de desarrollo, y se analizaron los cromosomas 13,15,16,17,18,21,22, X e Y. La transferencia tuvo lugar el 5º día de desarrollo. Para el análisis estadístico se realizaron la prueba de Chi-cuadrado y

T-student, considerando estadísticamente significativos valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

28 de los 48 pacientes con anomalías meióticas tuvieron un diagnóstico de FISH anormal (58,33%) y en los restantes el FISH resultó normal (41,67%).

El porcentaje de embriones haploides y poliploides, así como el índice de anomalías por cromosoma, fueron comparados y tampoco se hallaron diferencias entre los dos grupos.

DISCUSIÓN

El 41,67% de los pacientes con anomalías en la meiosis tienen un resultado normal en el estudio del FISH en espermatozoides.

Los pacientes con anomalías en la meiosis presentan un alto porcentaje de embriones cromosómicamente anormales, independientemente del resultado del FISH en espermatozoides. El DGP debería ser recomendado a estos pacientes, ya que se pueden obtener altas tasas de embarazo y de implantación.

	Meiosis anormal + FISH normal	Meiosis anormal + FISH anormal	p
Num. Ciclos	32	25	
\bar{x} edad mujer (95% IC)	33,91 (32,05-35,76)	32,60 (30,72-34,48)	NS
\bar{x} ovocitos (95%IC)	13,75 (11,28-16,22)	11,24 (9,01-13,47)	NS
\bar{x} embriones biopsiados (95%IC)	4,19 (3,15-5,23)	5,24 (4,01-6,47)	NS
\bar{x} embriones informativos (95%IC)	4,09 (3,05-5,14)	5,12 (3,95-6,29)	NS
\bar{x} embriones anormales (%)	2,44 (61,21%)	2,80 (52,90%)	NS
\bar{x} embriones transferidos (95%IC)	1,67 (1,37-1,96)	1,95 (1,67-2,23)	NS
Num. transferencias (%)	24 (75,00%)	20 (80,00%)	NS
Num. gestaciones (%)	11 (45,83)	12 (60,00%)	NS
Num. abortos (%)	1 (9,09%)	2 (16,67%)	NS
Tasa de implantación	36,81 %	42,50%	NS

Tabla 1: Resultados de los ciclos de DGP.

013: PERFIL METABOLÓMICO EN LOS MEDIOS DE CULTIVO DE EMBRIONES BAJO CONDICIONES DE HIPOXIA

P. Gámiz, F. Domínguez, S. Pérez, J. LL. Romero, T. Viloria, M.J. De Los Santos.
Instituto Valenciano de Infertilidad. IVI Valencia
e-mail: Pilar.Gamiz@ivi.es

INTRODUCCIÓN

En muchos casos, las técnicas de Fecundación *in vitro* obligan a ovocitos y embriones a crecer en diferentes medios de cultivo con diferentes formulaciones, así como en condiciones de oxígeno atmosféricas (20%) muy distintas a las encontradas *in vivo*. Los estudios de metabolómica permiten analizar de forma global, ínfimos cambios en las concentraciones de los diferentes metabolitos en el medio donde crecen los embriones, dando información acerca de la utilización por parte del embrión de diferentes sustancias presentes en el cultivo.

OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo fue analizar si los preembriones humanos cultivados en distintas concentraciones de oxígeno (5% y 20%) sufren algún tipo de cambio en su metabolismo que pueda reflejarse en la composición final del medio de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron un total de 41 muestras de medio de cultivo (n=24 en 5% de O₂ y n= 17 en 20% de O₂) de embriones

pertenecientes a 23 pacientes de nuestro programa de ovodonación con un 100% de tasa de implantación. Los medios de cultivo y sus controles blancos fueron recogidos en día 3 de desarrollo embrionario y almacenados a -186° C hasta su posterior análisis. No se observaron diferencias en la media de edad de las donantes en ambos grupos (26.2 y 25.8 respectivamente), así como en la calidad de los embriones en día +2 y +3 de desarrollo. Las muestras fueron descongeladas, se extrajeron los metabolitos y fueron inyectadas en el cromatógrafo líquido de alta presión (UPLC) acoplado a espectrómetro de masas (MS). Se midieron todos los metabolitos endógenos presentes en las muestras definidos por su relación masa/carga y su tiempo de retención. Para el análisis estadístico se realizaron análisis univariantes (comparación de medias) de cada metabolito encontrado entre ambos grupos y multivariante (análisis de componentes principales) para encontrar diferencias globales entre grupos.

RESULTADOS

El análisis multivariante del perfil metabolómico global de los embriones cultivados en hipoxia *versus* los

cultivados en condiciones atmosféricas de oxígeno, no reveló diferencias significativas entre ambos grupos. A pesar de no observarse diferencias en el perfil global, mediante análisis univariante, dos metabolitos definidos por su relación masa/carga y tiempo de retención, aparecieron significativamente elevados, mientras que un tercero aparecía disminuido en el grupo de embriones que se había cultivado en bajas tensiones de oxígeno.

CONCLUSIÓN

El cultivo de los preembriones humanos en baja tensión de oxígeno no pareció modificar de forma significativa sus rutas metabólicas durante el crecimiento *in vitro*.

No se observaron cambios en el perfil de consumo de piruvato, lactato o glucosa, así como tampoco en los niveles de aminoácidos como Asn, Gly o Leu utilizados como marcadores de implantación. Estos resultados puede ser interpretados como un ejemplo más de la plasticidad del embrión humano a los condicionamientos externos del cultivo *in vitro*.

014: EFICACIA DE LA VITRIFICACIÓN DE EMBRIONES EN DÍA 4

J. Guerrero, J. Ten, M. Pérez, J. Llácer, R. Bernabeu
Instituto Bernabeu Alicante
e-mail: jguerrero@institutobernabeu.com

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de un programa de criopreservación embrionaria eficaz es fundamental para cualquier unidad de Reproducción Asistida, ya que la congelación de embriones supernumerarios permite optimizar el tratamiento aumentando la tasa de embarazo por punción, además de

contribuir a reducir el embarazo múltiple, en la medida en la que la disponibilidad de los embriones para congelar favorece la decisión de transferir menos embriones. No cabe duda de que la incorporación de la vitrificación como técnica de rutina ha contribuido enormemente a mejorar los resultados. En la literatura encontramos numerosos trabajos en los que se evalúa la eficacia

de la vitrificación de embriones en día 3 y en estadio de blastocisto, mientras que es testimonial en el caso de embriones en día 4. El objetivo de este estudio es analizar los resultados obtenidos con la vitrificación de embriones en día 4 y valorar su eficacia comparándolos con los obtenidos en día 5.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron retrospectivamente 131 ciclos de criotransferencia realizados en nuestro Centro de los cuales 21 son ciclos de embriones vitrificados en día 4 (grupo I) y 110 en día 5 (grupo II). Se incluyeron criotransferencias derivadas tanto de ciclos de estimulación ovárica como de donación de ovocitos. Los parámetros más relevantes analizados fueron la tasa de supervivencia

embrionaria, tasa de β -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 significativa una *P* valor <.05.

RESULTADOS

Los resultados más relevantes se muestran en la siguiente tabla.

CONCLUSIONES

La menor tasa de supervivencia observada en blastocisto se debe probablemente al elevado volumen de fluido contenido en el blastocele, que favorece la formación de cristales de hielo. De acuerdo con nuestros datos, la vitrificación de embriones en día 4 es al menos tan eficaz como la vitrificación en día 5, presentándose como una alternativa viable.

	DÍA 4 (21)	DÍA 5 (110)	P valor
% de pacientes con transferencia	95,2	86,4	NS
Tasa de supervivencia (%)	94,8	82,2	0,012
Embriones transferidos (media \pm SD)	2,25 \pm 0,5	2,19 \pm 0,5	NS
β -hCG + (%)	60,0	58,9	NS
Tasa de embarazo clínico (%)	60,0	44,2	NS
Tasa de implantación (%)	30	26,5	NS
Aborto clínico (%)	33,3	21,4	0,042
Embarazo múltiple (%)	0	21,4	0,021

015: ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE CUATRO miRNAs EN INDIVIDUOS FÉRTILES E INFÉRTILES: IMPLICACIONES REPRODUCTIVAS

A. Salas-Huetos, J. Blanco, F. Vidal, E. Anton

Unidad de Biología Celular, Facultad de Biociencias, Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). 08193 Bellaterra.

e-mail: albert.salas@uab.cat; ester.anton@uab.cat

INTRODUCCIÓN

Los miRNAs son moléculas de 22-24nt implicadas en la regulación de la expresión génica de numerosos procesos biológicos. Se han identificado perfiles alterados de expresión de miRNAs en varios casos de infertilidad masculina poniendo de manifiesto el papel fundamental de estas moléculas en la regulación de la fertilidad.

OBJETIVOS

Caracterizar los patrones de expresión de cuatro miRNAs en RNA espermático procedente de individuos fértiles e infértiles, y relacionar las posibles diferencias de expresión con la presencia del fenotipo infértil.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron cuatro muestras de semen procedentes de cuatro individuos control y cuatro muestras de individuos con problemas de fertilidad de origen idiopático. La fracción celular espermática fue separada de las células somáticas mediante el método de *Somatic Cell Lysis*.

El RNA de los espermatozoides fue extraído mediante el método TRIzol y seguidamente, purificado mediante un tratamiento con DNasa. La calidad y cantidad extraída se determinó utilizando un espectrofotómetro UV/visible (Nanodrop-2000; ThermoScientific).

Se realizó una RT-PCR de las muestras de RNA y seguidamente una PCR con cebadores exón-exón para el gen de la Protamina-1. Con esta estrategia los productos resultantes de la amplificación del RNA podrían ser diferenciados de los resultantes de la amplificación del DNA.

Seguidamente, se realizó una RT-PCR para cuatro miRNAs: hsa-miR-23a, hsa-miR-744, hsa-let-7f y hsa-miR-1 junto con el gen normalizador Mamm-U6 utilizando TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). El cDNA se diluyó con los cebadores correspondientes (TaqMan MicroRNA Assays) y se realizó la PCR a tiempo real con el kitTaqMan Universal PCR Master MixII(Applied Biosystems). Se

analizaron 3 réplicas para cada muestra mediante la plataforma 7900HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems).

La cuantificación de las diferencias de expresión se determinó mediante el cálculo del estadístico *Fold Change* a partir de la variable Ct normalizada (Δ Ct). La variable Ct indica el ciclo de PCR en que los miRNAs son detectados; es por tanto un reflejo de la cantidad o la expresión. El valor de *Fold Change* se calcula a partir de la relación numérica entre la media de los valores Δ Ct de los cuatro controles con cada uno de los Δ Ct obtenidos en individuos problema. Valores de *Fold Change* <1 indican una menor expresión, el incremento de expresión se refleja mediante valores >1. Estas diferencias de expresión se consideraron significativas cuando el valor de Δ Ct se situaba fuera del intervalo de confianza calculado partir de la media ($\pm 1.96 \cdot DE$) de Δ Ct en las muestras control.

RESULTADOS

El método TRIzol permitió obtener una media de $2.6 \cdot 10^{-5}$ ng d'RNA por espermatozoide. La pureza media de todas las muestras se situó en torno a 1.72 (± 0.05). Ambos resultados se ajustan a lo descrito en la bibliografía.

Los resultados de las PCRs para el gen de Protamina-1 confirmaron la ausencia de DNA genómico. Estos resultados verifican que la extracción de RNA y el tratamiento con DNasa permiten la obtención de un RNA libre de contaminaciones de DNA.

Los resultados del ensayo TaqMan identificaron tres de los cuatro miRNA analizados: let-7f, miR-23a y miR-744. En cambio, ninguna de las muestras mostró resultados de Ct para miR-1 compatibles con la presencia de esta molécula en espermatozoides. En dos de los tres miRNA identificados (miR-23a y miR-744) se observaron cantidades equivalentes entre muestras control y problema. En cambio, let-7f mostró una reducción significativa

de la expresión en tres de los cuatro individuos problemas.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados, aunque preliminares debido al número de muestras y miRNAs analizados, sugieren la existencia de diferencias de expresión para algunos miRNAs entre individuos fértiles e infértiles. Estos datos serían de gran interés para ayudar al esclarecimiento de las bases genéticas de la infertilidad masculina de origen idiopático.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias a la aportación de muestras del Instituto Valenciano de Infertilidad de Valencia y la Unidad de Reproducción Asistida Centro Médico Teknon de Barcelona. El trabajo se ha desarrollado mediante la financiación de los proyectos FIS PS-09-00330 y 2009/SGR00282. AS-H es el beneficiario de una beca predoctoral PIF de la UAB456-01-1/E2010.

016: RESULTADOS PRELIMINARES DEL CULTIVO EMBRIONARIO EN HIPOXIA

B. Ramos, I. Moragues, A. Montoya, N. Wegmann, J. Aizpurua
IVF SPAIN
e-mail: b.r_m@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Numerosos trabajos han estudiado la importancia de la concentración de oxígeno en el cultivo embrionario. Varios autores han mostrado tasas superiores de embarazo clínico, implantación y nacidos vivos. La mayoría de los estudios sobre la hipoxia comparan la concentración atmosférica (20%) y la fisiológica (5%), pero muy pocos estudian una concentración intermedia (10%).

OBJETIVOS

Estudiar el efecto de la concentración de oxígeno en las tasas de fecundación, calidad embrionaria en D3/D5 (blastulación) y gestación química.

Estudiar el efecto de la concentración de oxígeno sobre el ovocito desde D0 hasta D1.

Evaluar la concentración de oxígeno para obtener el mayor rendimiento de blastocistos/ciclo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se diseñó un estudio prospectivo aleatorio de 56 pacientes para un tratamiento de ovodonación. Se comparan tres protocolos de cultivo ovocitario/embrionario: A) D0 (punción) a D1 (fecundación) a 5%O₂, 6%CO₂, 37°C (N=14); B) D0 (punción) a D1 (fecundación) a 10%O₂, 6%CO₂, 37°C (N=14); C) D0 (punción) a D1 (fecundación) a 20%O₂, 6%CO₂, 37°C (N=14). El resto del cultivo embrionario

(D1 hasta D3 o D5) se trasladan a 5%O₂, 6%CO₂, 37°C. Los medios de cultivo utilizados son de la serie G5 de Vitrolife (Vitrolife, Sweden AB) y los incubadores son Labotect C60 (Göttingen, Germany). Las muestras seminales se capacitan utilizando gradientes de densidad. El análisis estadístico con un índice de confianza del 95% se realiza mediante el test t de Student para muestras pareadas y variables continuas, y mediante el χ^2 con corrección de Yates para muestras porcentuales.

RESULTADOS

Se aplican los test estadísticos comparando entre los tres grupos de forma pareada (A y B, B y C, A y C). Los datos de mayor interés y con mayor índice de significación son: las

tasas de fecundación entre 5%-10% (P=0.0001) y 5%-20% (P=0.0004), las tasas de calidad embrionaria/blastulación entre 5%-20% (P=0.0241). Obtenemos significación, entre el tipo de tratamiento y en el número total de CCO y ovocitos maduros, entre 5%-20%. Aunque no hallamos diferencias significativas en la tasa de gestación química entre los tres grupos, existe una ligera tendencia de aumento a 10% de O₂. Futuras investigaciones con mayor tamaño muestral nos ayudará a obtener las condiciones óptimas de cultivo embrionario.

CONCLUSIONES

El oxígeno es uno de los parámetros con mayor diferencia entre el exterior e interior del útero, siendo así, numerosos autores han obtenido diferencias en calidad embrionaria y tasas de gestación entre 5% y 20% (en todo el cultivo embrionario o solo entre D0-D3-D5), aunque no existen apenas comparativas con el 10%. Halicigil y col. (Halicigil et al. 2007, 0-054, ESRHE, 2007) no halló diferencias significativas entre 5 y 10% en el cultivo hasta D3. Nuestros datos sí muestran diferencias

significativas, siendo el cultivo a 5% O₂ entre D1-D5. Al igual que multitud de autores, obtenemos diferencias importantes de blastulación entre 5% y 20%, siendo la mayoría de nuestras transferencias embrionarias en D5. Cuando utilizamos valores de oxígeno situados entre los convencionales (utilizando O₂ al 10%), conseguimos mejorar significativamente (respecto a 5%) nuestros resultados en tasa de fecundación y gestación.

	Protocolo A 5%O ₂	Protocolo B 10%O ₂	Protocolo C 20%O ₂	P valor		
				A-B (5%-10%)	B-C (10%-20%)	A-C (5%-20%)
No. Ciclos analizados	14	14	14			
No. CCO obtenidos, N (x±SD)						
Total	156 (11.14±3.66)	176 (12.57±4.16)	212 (15.14±7.93)	0.1891	0.3261	0.0428
No. Ovocitos maduros	137 (9.79±2,81)	158 (11.29±3,15)	193 (13.79±7.51)	0.1484	0.2842	0.0401
No. Tratamientos, N (%)						
ICSI	7 (50%)	2 (14,29%)	1 (7,14%)	0.1055	0.5412	0.0365
PICSI	4 (28,57%)	0 (0%)	1 (7,14%)	0.1052	0.3085	0.3237
FIV	0 (0%)	4 (28,57%)	1 (7,14%)	0.1052	0.3237	0.3085
MIXTO*	3 (21,43%)	8 (57,14%)	11 (78,58%)	0.1217	0.4183	0.0082
Tasa de fecundación, n/N (%)	76/137 (55,47%)	123/158 (77,85%)	144/193 (74,61%)	0.0001	0.5610	0.0004
Embriones de buena calidad**, n/N (%)	33/75 (44%)	40/121 (33,06%)	37/134 (27,61%)	0.1651	0.4183	0.0241
No. De transferencias***	14	14	13			
No. Embriones transferidos, N (x±SD)	28 (2.00±0.55)	26 (1.86±0.53)	25 (1.92±0.49)	0.5470	0.6727	0.7533
Tasa de gestación químico, n/N (%)	8/14 (57,14%)	10/14 (71,43%)	7/13 (53,85%)	0.6933	0.5847	0.8632
No. Muestras normozoospermicas****, N (%)	10/14 (71,43%)	12/14 (85,71%)	12/14 (85,71%)	0.6451	1,0000	0.6451
Procedencia muestra seminal, N (%)						
Donante	1 (7,14%)	1 (7,14%)	4 (28,57%)	1,0000.	0.3237	0.3237

* Mixto: FIV+ (ICSI/PICSI)

** Embriones de buena calidad: 8 células G1 en D3 o Blastocisto en D5

*** 20%O₂: un caso no tuvo transferencia

**** Según OMS 2010

017: INFLUENCIA DE LA VITRIFICACIÓN EN LA VIABILIDAD DE LOS OVOCITOS: ESTUDIO COMPARATIVO RETROSPECTIVO ENTRE LA DONACIÓN DE OVOCITOS EN FRESCO VERSUS OVOCITOS VITRIFICADOS

M. Solé, J. Santaló, M. Boada, B. Coroleu, PN. Barri, A. Veiga
 Institut Universitari Dexeus
 e-mail: miqsol@dexeus.com

INTRODUCCIÓN

A pesar de que hace ya más de 20 años desde la consecución del primer

nacimiento tras la congelación/descongelación de ovocitos humanos (Chen et al., 1986), no se han alcanzado resultados satisfactorios

hasta la optimización de las técnicas de criopreservación con este tipo de células.

Hasta el momento la técnica que parece ofrecer mayor eficiencia es la desarrollada por el grupo de Kuwayama (Kuwayama et al., 2005), confirmados posteriormente (Nagy et al., 2009; Rienzi et al., 2010; Cobo et al., 2010).

A pesar de ello, son necesarios estudios comparativos entre la utilización de ovocitos en fresco y ovocitos vitrificados para poder evaluar realmente la eficiencia de la técnica.

OBJETIVO

En el presente estudio se pretende comparar los resultados obtenidos (supervivencia, tasa de embarazo e implantación) con ovocitos en fresco y tras vitrificación en el programa de donación del Institut Universitari Dexeus.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo que incluye 57 donaciones de ovocitos (periodo entre junio-2009 y abril-2010). Se han incluido todas las donaciones de ovocitos que han respondido a la estimulación con suficientes ovocitos para ser compartidos entre dos receptoras: una parte de los ovocitos fueron donados en fresco a una receptora sincrónica y el resto se vitrificaron para una futura donación (Banco de ovocitos). Los criterios de inclusión de las donantes han sido descritos recientemente (Clua et al., 2010).

La media de edad de las receptoras sincrónicas y asincrónicas fue de 42.6 ± 5.0 y 41.4 ± 4.5 respectivamente. La media de edad de las donantes fue de 26.1 ± 5.8 . Los ovocitos en fresco se inseminaron a las 4 horas de la punción folicular mientras que los ovocitos para el Banco se vitrificaron inmediatamente después de la denudación de los mismos (dos horas post-punción folicular). El método empleado para la vitrificación de ovocitos se basa en el descrito por Kuwayama (Kuwayama et al., 2005). Tras la desvitrificación se cultivaron los ovocitos durante dos horas, momento en el que se realizó la microinyección intracitoplasmática.

Se determinó el embarazo clínico mediante la observación de saco gestacional a las 6 semanas de gestación. Se usaron test pareados para las comparaciones de las muestras de acuerdo con la donante de ovocitos común. Se aplicó el test de Wilcoxon para comparar medias y el test de McNeamar para proporciones. Todos los test fueron bilaterales estableciendo el nivel de significancia en $\alpha=0.05$.

RESULTADOS

Las receptoras sincrónicas recibieron un total de 625 ovocitos maduros (11.0 ± 2.8) y las receptoras del Banco de ovocitos, 584 (10.3 ± 2.1). La tasa de supervivencia tras la desvitrificación fue del 82.0% (479/584). La media de ovocitos inseminados por receptora

asincrónica se redujo a 8.4 ± 2.0 siendo significativamente más baja que los donados/inseminados en el grupo de receptoras sincrónicas ($p < 0.01$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las receptoras de ovocitos en fresco y vitrificados en las diferentes variables estudiadas: tasa de fecundación (78.1% versus 77.2%), tasa de embriones evolutivos (71.1% versus 67.6%) ni en la tasa de embriones óptimos (50.0% versus 46.1%).

La media de embriones transferidos por receptora fue similar entre el grupo de receptoras sincrónicas y asincrónicas (1.82 ± 0.47 y 1.91 ± 0.34). La tasa de embarazo por transferencia fue estadísticamente equivalente entre los dos grupos (47.4% versus 56.1%). De igual modo, la tasa de implantación fue similar entre el grupo de receptoras sincrónicas y asincrónicas (35.6% versus 34.9%).

CONCLUSIONES

Basándonos en los resultados obtenidos en el presente estudio podemos otorgar a los ovocitos vitrificados el mismo potencial de viabilidad y desarrollo que los ovocitos en fresco. La donación de ovocitos procedentes de Banco, tras vitrificación puede ser considerada una alternativa real a la donación sincrónica de ovocitos en los programas de donación de ovocitos.

018: ALTERACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL EN UNA POBLACIÓN DE JÓVENES ESPAÑOLES DURANTE LOS AÑOS 1999 Y 2010

A. Yoldi; A. Vaquero; JP. Ramírez y JA. Castilla.
Banco de semen CEIFER, Granada
e-mail: alberto.yoldi@ceifer.com

INTRODUCCIÓN

Dado el debate científico establecido en relación a la disminución de la calidad seminal anual y su referencia como marcador de un descenso de la capacidad reproductiva humana, presentamos un estudio retrospectivo en el que hemos analizado la calidad seminal de todos los aspirantes a donante de semen que

han acudido a nuestro centro entre los años 1999 a 2010.

OBJETIVOS

Analizar diferentes parámetros de calidad seminal en una población joven granadina durante los años 1999 y 2010 y valorar su posible disminución durante el período de años indicado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras se han obtenido por masturbación con un período de abstinencia sexual de 3 a 5 días. Han sido analizadas con microscopio de contraste de fases atemperado a 37°C y metodología definida por el Manual OMS en sus diferentes ediciones. El personal investigador está 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 candidato a donante (n = 2287). La población objeto de estudio

tiene una edad media de 22.17 años (± 4.26 SD).

Las características seminales analizadas han sido: concentración, volumen, nº total de espermatozoides en eyaculado y % espermatozoides progresivos (A+B).

RESULTADOS

Tras la eliminación de los *outliers*, por el método del recorrido intercuartílico, hemos obtenido la siguiente estadística descriptiva:

	n	\bar{x}	s.d.
Concentración	2218	75.6x10 ⁶ /ml	46.97
Volumen	2208	3.7 ml	1.46
Total	2201	361.8x10 ⁶	171.95
% Progresivos	2238	45.5 %	14.16

Al aplicar un análisis de regresión y correlación al período de 12 años que abarca nuestra serie, obtenemos unas rectas de regresión lineal en las que se aprecia una disminución significativa ($p < 0.01$) en tres de las cuatro variables estudiadas (concentración, nº total de espermatozoides eyaculados y % de espermatozoides progresivos A+B). La única variable que ha experimentado un aumento significativo durante el período de años estudiado, ha sido el volumen seminal ($p < 0.01$).

CONCLUSIONES

Tras estudiar una población de 2287 aspirantes a donante de semen durante los años 1999 a 2010, se evidencia una disminución estadísticamente significativa en los siguientes parámetros: concentración, nº total de espermatozoides eyaculados y % de espermatozoides progresivos (A+B). Sin embargo, el volumen seminal aumenta significativamente durante los años que abarca el estudio.

Dada la naturaleza de nuestra serie, los resultados obtenidos son representativos de la población joven granadina y no de la población en general. Este estudio se complementará con otros, en sucesivos años, para valorar si este descenso sigue una tendencia generalizada o si obedece a un patrón aislado.

019: MEJORA DE LA EFICACIA DE LA VITRIFICACIÓN DE BLASTOCISTOS EXPANDIDOS MEDIANTE LA INDUCCIÓN DEL COLAPSO DEL BLASTOCELE CON UN SISTEMA LÁSER

E, Ferrer, M, Ferrer, P, Muñoz, M, Vila.
CREA, Centro Médico de Reproducción Asistida, Valencia
e-mail: empar.ferrer@creavalencia.com

INTRODUCCIÓN

Desde el primer embarazo con blastocistos vitrificados en 2000, se han realizado numerosos estudios para mejorar el uso, seguridad y aplicación de la técnica, valorándose las concentraciones y tipos de crioprotectores, soportes, temperaturas de enfriamiento y calentamiento. A pesar de los avances que se han ido produciendo, existen numerosas publicaciones que refieren una correlación negativa entre el grado de expansión del blastocele y la tasa de

supervivencia a la vitrificación. Una de las técnicas propuestas para mejorar la efectividad de la técnica es el Colapso del Blastocele, previo a la vitrificación del Blastocisto.

OBJETIVOS

Valoración de la efectividad del colapso del blastocele, previo a la vitrificación de blastocistos expandidos, inducido mediante un sistema Láser. Análisis de las tasas de supervivencia a la vitrificación y de eclosión tras 24 horas de cultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se vitrificaron 53 blastocistos expandidos procedentes de fecundaciones anómalas. El grupo control fueron 27 blastocistos que se vitrificaron sin intervención adicional. Los 26 restantes se les indujo el colapso del blastocele mediante Láser.

Cada blastocisto expandido se valoró siguiendo los parámetros de Veeck (2003), clasificándolos según su calidad en Óptimo o Sub-óptimo. Se valoraron la masa celular interna (MCI) y el

trofooctodermo (TE). Se consideraron Sub-óptimos aquellos con MCI y TE tipo C o D, y Óptimos aquellos con MCI y/o TE tipo A o B.

Previamente a la vitrificación se indujo el colapso del blastocele utilizando el sistema Láser Saturn Active, disparando uno o dos pulsos (de 0,500 a 0,752mS, con una potencia fija de 400mw) entre la unión de dos blastómeras del trofooctodermo, en el lado opuesto a la MCI.

Los pasos de equilibrado y vitrificación se realizaron a temperatura ambiente utilizando concentraciones de crioprotectores de 7,5% etilenglicol (EG), 7,5% dimetilsulfóxido (DMSO) y 15% EG con 15% DMSO. Como soporte se utilizó el sistema Cryotop.

Post desvitrificación se valoraron las tasas de supervivencia y eclosión tras 24 horas de cultivo, según las calidades de los blastocistos. Todo el cultivo

embrionario se realizó bajo hipoxia controlada, en incubadores K-Systems G-185 con una atmósfera de un 6% de CO₂ y 5% de O₂.

RESULTADOS: Se ha observado una mejora significativa en la supervivencia a la vitrificación en aquellos blastocistos a los que se les realizó previamente el colapso del blastocele mediante Láser (96,0%), respecto al grupo control (66,7%).

Esta diferencia es aun más clara en Blastocistos Sub-óptimos (100% supervivencia con colapso vs 36,4% sin colapso), mientras que en los Blastocistos Óptimos la diferencia no alcanza la significancia estadística (93,3% vs 87.5%).

También se observa una mejora significativa en las tasas de eclosión tras 24 horas de cultivo post desvitrificación (69,2% en los colapsados vs 20,8% en los no colapsados).

Si diferenciamos según las calidades morfológicas, obtuvimos en Blastocistos Óptimos unas tasas del 69,2% vs 20,8% y en Sub-óptimos una tasa del 54,5% vs 0%, siendo en ambos casos las diferencias estadísticamente significativas.

CONCLUSIONES: El uso del Láser para realizar el colapso del blastocele en blastocistos expandidos es una técnica rápida y eficaz.

En blastocistos expandidos Sub-óptimos, el colapso del blastocele mediante un sistema Láser previamente a su vitrificación, mejora las tasas de supervivencia.

La realización del colapso del blastocele en blastocistos expandidos mediante un sistema Láser antes de la vitrificación, mejora la probabilidad de eclosión tanto en blastocistos Óptimos como en Sub-óptimos, proceso necesario para la posterior implantación.

O20: ¿DISMINUYEN LAS TASAS DE GESTACIÓN E IMPLANTACIÓN EN LOS CICLOS VITRIFICADOS FRENTE A LOS CICLOS EN FRESCO?

M. De Las Heras, T. Ganzabal, A. López de Larrucea, JA. Agirregoikoa, G. Barrenetxea, JL. De Pablo
Unidad de Reproducción Asistida Quirón Bilbao
e-mail: mariadlhm@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La mejora en los protocolos de estimulación y en los métodos de cultivo embrionario y la disminución en el número de embriones transferidos ha provocado que el número de embriones sobrantes de buena calidad por paciente tras un ciclo de FIV haya aumentado. Este hecho hace necesaria la existencia de un método eficiente de criopreservación que permita el almacenamiento de estos embriones maximizando así la efectividad acumulada de un ciclo de FIV. En los últimos años la vitrificación se está convirtiendo en el método de elección para la criopreservación de embriones humanos debido a su alta tasa de supervivencia y embarazo. Se basa en el uso combinado de elevadas concentraciones de crioprotector con el mínimo volumen de medio y tasas de enfriamiento ultrarrápido, evitando así la formación de hielo y con ello el daño celular.

OBJETIVO

Evaluar la efectividad de la vitrificación de embriones comparando las tasas de embarazo e implantación entre transferencias de embriones en fresco y transferencias de embriones vitrificados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron en el estudio un total de 453 transferencias en fresco tras ciclos de fecundación in vitro (FIV/ICSI) y 252 transferencias de embriones vitrificados. La media de edad de las pacientes era de 35,6 años. En los ciclos en fresco la transferencia se llevo a cabo en D+3 de desarrollo embrionario. En los ciclos de vitrificación, los embriones se vitrificaron en D+3 y se desvitrificaron la mañana de la transferencia usando el método de cryotop de Kitazato (BioPharma.CO.,Ltd). Los embriones

fueron clasificados de acuerdo al score de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) y las transferencias incluidas en el estudio fueron aquellas en las que se transfirieron dos embriones de la misma calidad o transferencias únicas. El embarazo clínico se determinó 4 semanas post- transferencia con presencia de saco gestacional.

RESULTADOS

En las transferencias de embriones vitrificados la tasa de embarazo tras la transferencia de dos embriones de muy buena calidad (AA) fue 46%, 31% cuando se transfirió un único embrión de muy buena calidad (A), 28% tras la transferencia de dos embriones de buena calidad (BB) y 24% cuando se transfirieron dos embriones de calidad media (CC). Las tasas de embarazo en los ciclos en fresco fueron 41%,

28%, 32% y 18% respectivamente, no mostrando diferencias significativas entre ambos grupos ($p>0.05$). Las tasas de implantación tampoco mostraron diferencias significativas (32% vs. 27%; 31% vs. 28%; 17% vs. 21% y 12% vs. 9%) ($p>0,05$).

CONCLUSIONES

Las tasas de gestación e implantación no muestran diferencias significativas tras la transferencia de embriones vitrificados frente a la transferencia en

fresco de embriones de la misma calidad. La vitrificación no sólo debería ser la técnica de criopreservación de elección en la rutina del laboratorio de FIV para la criopreservación de los embriones sobrantes, sino también en los casos en los que la transferencia tenga que posponerse. En estos casos, como pueden ser pacientes que presentan síndrome de hiperestimulación ovárica, sangrados, ciclos de diagnóstico genético preimplantacional en los cuales es necesario acumular embriones o ciclos de donación, es imprescindible

que la técnica de criopreservación minimice la pérdida embrionaria y mantenga tasas de éxito comparables a las obtenidas con embriones en fresco.

En los últimos años se ha debatido sobre los efectos deletéreos sobre el endometrio y los embriones de los niveles suprafisiológicos de estradiol en los ciclos de FIV. La vitrificación permitiría posponer la transferencia sin disminuir la probabilidad de embarazo y evitar así los posibles efectos adversos.

O21: EFECTO DE LA MULTINUCLEACIÓN EN DIVISIÓN TEMPRANA EN EL POTENCIAL DE IMPLANTACIÓN DE EMBRIONES CON RITMO ÓPTIMO DE DIVISIÓN

MC. Pons, I. Solvas, M. Grossmann, R. Noblom, J. Nadal
Centro Médico Teknon. Unidad de Reproducción Asistida
e-mail: ura@cmteknon.com

INTRODUCCIÓN

Tanto la clasificación ASEBIR 2007 como el reciente trabajo del grupo de consenso en clasificación embrionaria (Alpha-ESHRE) penalizan fuertemente aquellos embriones que presenten algún blastómero multinucleado.

En un trabajo previo habíamos estudiado la incidencia de multinucleación en división temprana (DT) y observamos que la multinucleación detectada en este estadio es un fenómeno temporal que en día+2 desaparecía en el 75% de los embriones, aunque desconocíamos su significado clínico-biológico.

OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo será valorar el efecto de la multinucleación en DT en el potencial de implantación de estos embriones (no multinucleados en día+2), comparando los que presentaban multinucleación en DT frente a los que no la presentaban.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analiza retrospectivamente (años 2005- 2010) la nucleación de 1490 embriones con ritmo óptimo de división, es decir que en día+2 tenían 4-

ó 5-células y además habían presentado DT (observación temprana a las 26,2h post-fecundación de promedio).

Evaluamos la tasa de implantación a partir de transferencias con 100% implantación.

El promedio de edad de las mujeres cuyos ciclos de FIV incluimos fue de 34,6 años [rango: 20-47]. Análisis estadístico: χ^2 test, $P<0,01$.

RESULTADOS

De los 1490 embriones analizados, la incidencia de multinucleación en DT es del 17%, se observa en 256 embriones (tabla 1).

	DT		
	DT-no MNB	DT- MNB	n
	1234	256	1490
Día+2-no MNB	1121	175	1296
Día+2- MNB	113	81	194

Tabla 1

Corroborando nuestro estudio previo, en día+2 detectamos el fenómeno de reversión: no se observa presencia de multinucleación en 175 (68,3 %) de los 256 embriones que sí la presentaban en DT y, lo que es más sorprendente, en 123

de ellos podemos constatar la presencia de un único núcleo en cada blastómero (48%).

Comparando la tasa de implantación cuando se estudian transferencias homogéneas no se observan diferencias significativas entre los dos grupos estudiados (DT-no MNB vs DT- MNB) (tabla 2).

	DT-no MNB	DT- MNB	
Día+2-no MNB	1121	175	
Embriones descartados	230 (20%)	49 (28%)	ns
Embriones en transferencias homogéneas	554	47	
Implantación evolutiva	165 (29,8%)	9 (19,1%)	ns

Tabla 2

CONCLUSIONES

1/ Se confirma que la multinucleación detectada en DT es un fenómeno temporal y reversible.

2/ La multinucleación en DT no afecta negativamente a la tasa de implantación de los embriones con ritmo óptimo de división (embriones en los que no observamos multinucleación en día+2).

O22: PRIMERA SERIE DE RESULTADOS DEL PROGRAMA DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL DE 24 CROMOSOMAS MEDIANTE FISH

S. Fernández^{1,2}; A. Colomar^{1,2}; E. Toro¹; S. Chamosa¹; JG. Álvarez³; B. Peramo²; M. López Teijón³; E. Velilla^{1,2}

¹Institut Marquès, Barcelona; ²Centro de Medicina Embrionaria, Barcelona-Madrid; ³Fundación Leonardo Marquès, Barcelona; e-mail: silvia.fernandez@institutomarques.com

INTRODUCCIÓN

Con el objetivo de mejorar los resultados de los ciclos de FIV-DGP, se han utilizado diferentes aproximaciones, siendo una de ellas el estudio de todos los cromosomas en blastómero mediante diferentes técnicas. Nuestro grupo ha optimizado una técnica con elevada eficiencia y bajo coste, la técnica de FISH para 24 cromosomas. Tras su puesta a punto y validación, es necesario valorar la primera serie de resultados clínicos.

OBJETIVOS

Analizar los resultados obtenidos tras el FIV-DGP de 24 cromosomas (DGP-24) en cuanto a porcentaje de embriones cromosómicamente alterados, porcentaje de ciclos sin transferencia, tasa de embarazo y tasa de embarazo evolutivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó DGP-24 a 99 ciclos que se indicaron por presentar alguno o varios de los siguientes factores de riesgo: abortos de repetición, edad materna avanzada (>37), factor masculino genético y fallo de FIV. Todos los ciclos de DGP-24 fueron incluidos independientemente del número de embriones analizados. Se biopsiaron 538 embriones en día +3

y se analizaron mediante FISH con sondas de oligonucleótidos (Cellay), centroméricas y/o *locus* específicas (Vysis) para todos los cromosomas. La técnica de DGP-24 se realizó mediante 6 rondas de hibridación consecutivas y una o dos rondas con sondas subteloméricas (Vysis; Kreatech) para reanalizar todas las monosomías y poder diferenciar una monosomía real de un solapamiento de señales así como evitar los cromosomas no informativos. Los embriones cromosómicamente normales y morfológicamente aptos fueron transferidos en día + 5.

RESULTADOS

Un 75,7% de los ciclos (75/99) tuvieron embriones normales para realizar la transferencia con una media de embriones transferidos de 1,3. De los 538 embriones analizados, 377 resultaron alterados (70 %). El 80 % (300/377) de los embriones alterados hubieran sido detectados con el DGP estándar de 9 cromosomas (DGP-9) y un 20 % de embriones (77/300) presentaron alteraciones solo detectables mediante DGP-24. Estos embriones se hubieran considerado normales en un DGP-9 y por tanto hubieran sido transferidos, dando lugar en la mayoría de casos a no embarazo o aborto.

En los ciclos de DGP-24 se obtuvo una tasa de embarazo por transfer de 48% (36/75). La tasa de embarazo evolutivo en DGP-24 fue 32% (24/75). Actualmente, ya han nacido 6 bebés sanos procedentes de 5 embarazos de DGP-24.

Si valoramos la tasa de embarazo en los ciclos de DGP-24 en función del número de embriones analizados observamos una tasa de un 66,7% (24/36) en aquellos casos en que se analizaron 6 o más embriones y una tasa de 30,8% (12/39) en los casos de menos de 6 embriones. Estas diferencias son estadísticamente significativas $p=0.004$.

CONCLUSIONES

Tras el análisis de los datos obtenidos en la primera serie de casos realizados de DGP-24 podemos concluir que: (i) el DGP-24 detecta un 20% de embriones cromosómicamente alterados que se hubieran transferido con el DGP estándar de 9 cromosomas, (ii) analizar 6 o más embriones duplica la tasa de embarazo con significancia estadística ($P=0.004$) (iii) los primeros bebés nacidos mediante DGP-24, así como las buenas tasas de embarazo evolutivo obtenidas muestran el potencial que tiene dicha técnica en pacientes con riesgo de alteraciones cromosómicas.

O23: ESTABILIDAD EPIGENÉTICA EN GESTACIONES TRA

Camprubí C, Iglesias-Platas I, Martín-Trujillo A, Guillaumet-Adkins A, Rodríguez MA, Rodríguez D, Court F, Monk D
Programa de Epigenética y Biología del Cáncer (PEBC), Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL)
e-mail: ccamprubi@idibell.cat

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han publicado informes que relacionan las técnicas de reproducción asistida (TRA) con un incremento moderado en

la incidencia de restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) así como de síndromes causados por anomalías en la impronta genómica. La impronta genómica es un sistema de control de la expresión génica

que regula la expresión monoalélica de aproximadamente 50 genes en humanos, mediante modificaciones epigenéticas (metilación del DNA y modificaciones de las histonas).

Estas marcas específicas del alelo paterno y materno, se presentan en las denominadas Regiones Diferencialmente Metiladas (*Differentially Methylated Region-DMR*) del genoma, siendo la expresión monoalélica resultante de los genes regulados por estas DMR crucial para el correcto desarrollo neurológico, embrionario y de los tejidos extraembrionarios. La metilación diferencial presente en las DMR en las células diploides, se borra en las células germinales primordiales y la metilación específica del alelo paterno o materno se establece de nuevo en las espermatogonias del individuo adulto o durante el período de maduración de los ovocitos, respectivamente. Considerando que el proceso de establecimiento de la metilación en ovocitos es coincidente con la estimulación hormonal, planteamos que la estimulación ovárica y reclusión de numerosos ovocitos podría alterar el correcto establecimiento de la impronta materna. Asimismo, el cultivo in vitro de embriones preimplantacionales fuera del ambiente uterino, podría alterar el mantenimiento de la metilación

diferencial en las DMR después de la fecundación, tanto en el alelo materno como paterno, como ha sido demostrado en modelos animales. Estudios en el modelo murino han demostrado que células con anomalías en la impronta pueden quedar confinadas a la placenta (Mann et al., 2004), recordando el fenómeno de rescate observado en el caso de anomalías cromosómicas. En mamíferos, la placenta es crucial para el crecimiento fetal intrauterino y los genes regulados por impronta tienen un papel en la funcionalidad de este tejido, por lo que anomalías de la impronta presentes en la placenta podrían alterar su función normal, reflejarse en anomalías del crecimiento y apuntar así una correlación entre los datos epidemiológicos y un posible mecanismo.

OBJETIVOS

Obtener y valorar los perfiles de metilación de las DMR en niños de concepción espontánea y niños concebidos por TRA (estimulación ovárica, donación de ovocitos, FIV, ICSI).

MATERIAL Y MÉTODOS

El DNA genómico extraído de placenta y cordón umbilical será analizado mediante la tecnología de *arrays* de microesferas basada en la tecnología Illumina Goldengate. Este *array* permite cuantificar de forma simultánea la metilación de todas las DMR conocidas del genoma humano, así como de regiones promotoras de 150 genes relacionados con crecimiento y metabolismo.

RESULTADOS

Se compararán los perfiles de metilación obtenidos del análisis de una serie de 74 muestras (12 gestaciones gemelares, 4 gestaciones de trillizos y 38 gestaciones únicas) con aquellos obtenidos de una serie control y se discutirá la correlación de estos resultados con los parámetros del ciclo de reproducción así como con los datos clínicos de la gestación y del recién nacido.

024: ESTUDIO DEL PATRÓN DE MOVILIZACIÓN DE $[Ca^{2+}]_i$ Y DEL PAPEL DE LA ACTINA EN LA REACCIÓN ACROSÓMICA DE PACIENTES ASTENOZOOPÉRMICOS

G. Lozano, A. Ortiz, F. Monllor, M. Jiménez, J. Espino, I. Bejarano, JF. García, JA. Pariente, AB. Rodríguez
Centro Extremeño de Reproducción Humana Asistida. Hospital Materno e Infantil de Badajoz
e-mail: laoliventina@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Es conocido el papel del calcio intracitosólico $[Ca^{2+}]_i$ en la fisiología del espermatozoide, estando estrechamente relacionado con procesos de hiperactivación, quimiotaxis, control de la movilidad y su participación en la reacción acrosómica (RA)

También es conocido el papel que juega la Progesterona (PRG) en la inducción de la reacción acrosómica y actividad flagelar movilizándolo las reservas de $[Ca^{2+}]_i$ y favoreciendo la Entrada Capacitativa de Calcio (ECC), observándose niveles bajos de $[Ca^{2+}]_i$

en espermatozoides con problemas en la motilidad.

OBJETIVOS

Comparar la señal de $[Ca^{2+}]_i$ provocada por PRG y el papel del citoesqueleto de actina en la ECC en el eyaculado de pacientes normozoospermicos y astenozoospermicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de semen (n=25) de pacientes que acuden al C.E.R.H.A del H.M.I de Badajoz.

Se les realiza seminograma analizando morfología, concentración y movilidad mediante CASA, siguiendo las indicaciones de la OMS.

A las muestras tras incubarlas con 1 μ M de PRG, 1 μ M de Thapsigargina (inhibidor de la recaptación de $[Ca^{2+}]_i$ por la mitocondria), Citocalasina D y Jasplakinolide (inhibidor y activador de la polimerización de actina, respectivamente) se mide la movilización de $[Ca^{2+}]_i$ mediante un espectrofluorímetro y la sonda fluorescente Fura 2-AM.

Los datos se tratan estadísticamente mediante SPSS utilizando T-Student.

RESULTADOS

MOVILIZACIÓN DE $[Ca^{2+}]_i$ EN NORMOZOOSPÉRMICOS Y ASTENOZOOSPÉRMICOS EN RESPUESTA A PRG

1.- La PRG moviliza el $[Ca^{2+}]_i$

2.- Las células incubadas con 20 μ M de PRG + 1 μ M de Thapsigargina (inhibidor de la recaptación de $[Ca^{2+}]_i$ por la mitocondria) muestran una ECC significativamente menor en pacientes astenozoospermicos e independiente de la Thapsigargina.

3.- Al incubar las células con antagonistas de los receptores de la PRG (RU-38486) o con anticuerpos de los receptores de PRG (PR c262), la ECC se reduce significativamente.

EFFECTO DE LA CYTOCALASINA D Y JASPLAKINOLIDE EN LA ECC

1.- Las células estimuladas con PRG se incuban con Cytochalasina D y Jasplakinolide observándose inhibida la ECC en las mismas.

CONCLUSIONES

Los espermatozoides de pacientes astenozoospermicos presentan reducida su respuesta a la PRG, no permitiendo realizar una ECC tan elevada como la que se produce en espermatozoides sin alteración en su movimiento. Un déficit en los receptores de la PRG y su incapacidad para movilizar sus reservas de $[Ca^{2+}]_i$ convenientemente puede ser el responsable de sus problemas de movilidad.

025: EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DIETÉTICA CON DHA SOBRE LA CALIDAD SEMINAL

J.C. Martínez, J.C. Domingo, Cordovilla, M. Nicolás, L. Fernández, P. Albero, J. Landeras
IVI Murcia
e-mail: juancarlos.martinez@ivi.es

INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos omega 3 son componentes fundamentales de las membranas celulares. De ellos el ácido docosahexanoico (DHA) se encuentra en una alta proporción en la membrana de los espermatozoides y está implicado en numerosos procesos funcionales como son la reacción acrosómica, la fusión espermatozoide-ovocito o la motilidad espermática. Existen numerosos estudios que correlacionan la concentración de este ácido graso con la calidad espermática así como con la fertilidad masculina. Por otra parte diversos estudios coinciden en que los ácidos grasos omega-3 presentan una alta capacidad antioxidante, llegando incluso a modular la expresión génica de ciertas enzimas antioxidantes así como un excelente perfil de seguridad lo cual posibilita su uso como nutracéuticos con distintos campos de actuación.

OBJETIVOS

El objetivo del presente estudio es determinar el efecto que la suplementación dietética con DHA

ejerce sobre la calidad seminal, capacidad antioxidante y niveles de fragmentación de ADN de varones con alteración en los valores espermáticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo, aleatorizado, doble ciego con grupo control con 64 pacientes que acudieron a la clínica IVI Murcia para evaluación por problemas de infertilidad. Los pacientes incluidos en el grupo placebo (29) ingirieron 1050mg/día de aceite de girasol durante 10 semanas. Los pacientes del grupo DHA (35) ingirieron 1050mg de DHA durante el mismo periodo.

Se determinó volumen, concentración, motilidad, morfología, capacidad antioxidante total (TAC), composición lipídica tanto en la membrana espermática como en el plasma seminal, así como la fragmentación de ADN mediante test TUNEL. Todos estos parámetros fueron evaluados previamente al comienzo de la ingesta así como a las 5 y 10 semanas de iniciar la suplementación.

RESULTADOS

En las características seminales iniciales se observa una diferencia significativa entre el grupo placebo y el grupo suplementado con DHA tanto en el porcentaje de espermatozoides con motilidad total ($46,30 \pm 2,41$ vs $37,97 \pm 2,99$) ($p=0.02$) como con motilidad progresiva ($42,95 \pm 2,37$ vs $34,02 \pm 2,90$) ($p=0.04$). Estas diferencias entre grupos desaparecieron tras 10 semanas de ingesta de DHA.

Tras 10 semanas de tratamiento se observa una mejora significativa en el grupo suplementado con DHA tanto en la capacidad antioxidante del plasma seminal, pasando de unos niveles iniciales de $1.627,88 \pm 26,1$ equivalentes de Trolox a $1.794,84 \pm 37,44$ ($p<0,1$) como en los niveles de fragmentación de ADN pasando de $26,89 \pm 3,38\%$ a $11,01 \pm 1,65\%$ ($p<0,1$).

En el resto de parámetros espermáticos analizados no se observa variación significativa tras la conclusión del estudio.

La suplementación con DHA no originó cambios en la composición lipídica de la membrana de los espermatozoides, sin embargo se observó un incremento significativo en los niveles de DHA y ácidos grasos omega 3 en el plasma seminal pasando respectivamente de $3,47 \pm 0,21$ y $5,35 \pm 0,36$ a $4,75 \pm 0,27$ y $6,69 \pm 0,24$ ($p < 0,5$)

CONCLUSIONES

La suplementación dietética con ácido docosahexanoico presenta un marcado efecto antioxidante y ocasiona una disminución significativa en los valores de fragmentación de ADN espermático.

Es una herramienta terapéutica útil en el tratamiento de varones con altos niveles de fragmentación de ADN espermático.

Bajo nuestro conocimiento este es el primer estudio que evalúa la utilidad terapéutica del ácido docosahexanoico en el tratamiento de varones con esta patología seminal

Futuros estudios son necesarios para evaluar la eficacia de la ingesta de DHA en el éxito de los tratamientos de reproducción.

026: UTILIDAD DE LA ALTA MAGNIFICACIÓN PARA SELECCIONAR ESPERMATOZOIDES NORMALES GENÉTICAMENTE

M Dorado, M Hebles, B Migueles, M. González, L Aguilera, P Sánchez, F Sánchez
Clínicas Ginemed
e-mail: mdorado@ginemed.es

INTRODUCCIÓN

La imagen que obtenemos de los espermatozoides a alta magnificación permite observar anomalías estructurales indetectables a los aumentos convencionales, lo que permite seleccionar espermatozoides con mejor morfología. Es por ello por lo que algunos autores han demostrado que la selección de espermatozoides con microscopio de alta magnificación (6000x) mejora los resultados de ICSI, sobre todo en aquellos casos en los que existe daño testicular.

La alta magnificación nos permite hacer un estudio morfológico a 6000x y seleccionar a su vez los espermatozoides. Ya sea para hacer pruebas adicionales, por ejemplo: estudio de aneuploidías, como para microinyectar con los de mejor morfología.

OBJETIVO

El objetivo de nuestro estudio fue evaluar la eficacia de la alta magnificación para seleccionar espermatozoides genéticamente normales a partir de la morfología observada a esos aumentos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras de semen usadas para la selección se prepararon por gradiente de densidad en capas de 0,3 a 1 mL de 40% y de 0,3 a 1 mL de 80% de Sperm Grad (Vitrolife®) y Ham F-10 (Gibco) con gentamicina.

Los espermatozoides fueron depositados en una placa de microinyección específica para el microscopio de alta magnificación en gotas de HTF.

Los espermatozoides se observaron y capturaron uno a uno con el sistema de micromanipulación y depositados en un portaobjeto para su posterior análisis en cuatro grupos: grupo 1 (espermatozoides con cabezas grandes), grupo 2 (espermatozoides con cabezas elongadas), grupo 3 (espermatozoides con cabezas normales y grandes vacuolas) y grupo 4 (espermatozoides con cabeza normal sin vacuolas).

Cada espermatozoide fue colocado en una parte específica del portaobjeto en un 1µl de HTF y fijado con Carnoy posteriormente. El proceso se repitió para cada uno de los espermatozoides seleccionados obteniendo poblaciones de espermatozoides para cada grupo estudio.

Se utilizaron las sondas comerciales del kit Aneuvysion™ (Vysis) con las pruebas específicas para el cromosoma 18 (CEP 18 spectrumAqua™ 18p11-q11.1), para el cromosoma X (CEP X spectrumGreen™ Xp11-q11.1) y para el cromosoma Y (CEP Y SpectrumOrange™ Yp11-q11.1)

RESULTADOS

El FISH de espermatozoides realizado reveló presencia de alteraciones en todos los grupos estudiados. En el

grupo de espermatozoides con cabeza grande encontramos mayoritariamente espermatozoides con carga genética diploide, aunque también observamos la presencia de espermatozoides con disomías y con carga genética normal. El grupo de espermatozoides con cabezas elongadas mostraban espermatozoides con disomías en un número superior al que presentaba el grupo control no encontrando diferencias significativas entre ambos grupos. En los grupos de espermatozoides normales, tanto en el grupo control como en el que portaban vacuolas, el número de alteraciones genéticas era menor que en los otros grupos no obteniendo tampoco diferencias significativas.

CONCLUSIONES

Dado que nuestro estudio mostró presencia de alteraciones en todos los grupos estudiados podemos pensar que el tamaño y la forma de la cabeza no son condición suficiente para asegurar la carga genética del espermatozoide, y por tanto la alta magnificación no nos sería útil para asegurarnos espermatozoides genéticamente normales. A pesar de ello, esta herramienta nos permitió seleccionar distintos tipos que mostraron diferencias entre ellos aunque no llegaron a ser significativas. No obstante sería necesario aumentar el tamaño muestral y estudiar cada grupo más ampliamente.

027: DIFERENCIAS ENTRE EMBRIONES DE RATÓN OBTENIDOS DIRECTAMENTE DEL ÚTERO Y LOS CONSEGUIDOS POR FECUNDACIÓN IN VITRO

M. J. Perianes¹, V. Casas-Rua¹, J. Mijares², F. M. Sánchez-Margallo², I. S. Álvarez-Miguel¹.

¹Departamento de Biología Celular. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura. Badajoz. ²Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, Cáceres.

e-mail: mariojpc@unex.es

INTRODUCCIÓN

La fecundación *in vitro* (FIV) y el posterior cultivo en el laboratorio, pueden afectar el curso normal del desarrollo embrionario y por lo tanto la viabilidad de los embriones obtenidos mediante esta técnica. Sin embargo, no existen muchos estudios que comparen aspectos fisiológicos y celulares entre los embriones obtenidos por este procedimiento y los que se han desarrollado en el ambiente uterino. En este trabajo nos proponemos abordar esta cuestión utilizando embriones de ratón en fase de blastocisto.

OBJETIVOS

Comprobar si una serie de parámetros, posibles indicadores de la viabilidad embrionaria (volumen, nº de células, grosor de la zona pelúcida, % de muerte celular y actividad metabólica) son diferentes entre los blastocistos obtenidos mediante FIV con su posterior cultivo embrionario (in vitro) y blastocistos de la misma edad conseguidos directamente del útero (in vivo).

MATERIAL Y MÉTODOS

Los blastocistos in vivo se recuperaron a partir de ratonas adultas y preñadas, en día 4 de desarrollo embrionario. Por otra parte, los embriones desarrollados in vitro, se obtuvieron por fecundación in vitro convencional.

Para contar el número de células alcanzado por los embriones, se utilizó la tinción nuclear con DAPI (4,6-diaminidino-2-phenylindole).

Con el fin de calcular el % de células apoptóticas a partir del Nº de células teñidas con DAPI, se realizó la técnica TUNEL.

La estimación de la actividad metabólica de los embriones, se llevó a cabo con un ensayo con Alamar Blue® (AB).

El volumen embrionario y el grosor de la zona pelúcida, se evaluaron con un software adecuado de análisis científico de imagen.

Todos los datos fueron analizados empleando el paquete estadístico SPSS 17.0.

RESULTADOS

El número de células, que por término medio, alcanzan los embriones desarrollados en condiciones fisiológicas (Céls: 110,19), supera en un 27,5% a la media de los embriones obtenidos por fecundación in vitro (Céls: 86,42).

El conjunto de los embriones desarrollados en condiciones fisiológicas muestra un porcentaje de células apoptóticas (1,24 %) inferior al presentado por los embriones obtenidos por FIV (4,81%).

Los embriones obtenidos in vivo experimentan un ligero aumento en la actividad de su metabolismo (aumento en la reducción del Alamar Blue) respecto al conjunto de los embriones obtenidos por fecundación in vitro.

El volumen medio de los embriones obtenidos en condiciones fisiológicas ($478 \times 10^3 \mu\text{m}^3$) es significativamente mayor ($p < 0,001$) respecto al volumen de los embriones desarrollados in vitro ($304 \times 10^3 \mu\text{m}^3$).

Por otra parte el grosor de la zona pelúcida disminuye significativamente ($p < 0,001$) en los embriones obtenidos en condiciones fisiológicas ($5,7 \pm 1,5 \mu\text{m}^2$) respecto a los embriones obtenidos por FIV ($7,6 \pm 1,4 \mu\text{m}^2$).

CONCLUSIONES

Según hemos podido comprobar, varios de los parámetros estudiados en los blastocistos de ratón se ven afectados por el cultivo in vitro, indicando que el manejo en el laboratorio condiciona el desarrollo de los embriones. Las consecuencias que acarrearán estas diferencias, respecto a los embriones obtenidos en condiciones fisiológicas, pueden tener relevancia en la futura mejora de las técnicas de reproducción asistida.

028: ¿AFECTAN LOS NIVELES ALTOS DE ESTRADIOL A LAS TASAS DE ÉXITO DE LAS TRANSFERENCIAS DE LOS EMBRIONES VITRIFICADOS?

E. Martínez¹, M. de las Heras¹, J. A. Agirregoikoa^{1,2}, J. L De Pablo¹, y G. Barrenetxea^{1,2}.

¹ Quirón Bilbao, Unidad de reproducción Asistida, Vizcaya, España. ² Universidad del País Vasco (UPV), Vizcaya, España.

e-mail: emartinez.bil@quiron.es

INTRODUCCIÓN

El síndrome de hiperestimulación (SHEO) es la complicación aguda más grave de una estimulación ovárica. Consiste en un crecimiento de los ovarios junto con una hiperproducción hormonal esteroidea a nivel de los mismos. La mejor manera de evitar la SHEO es prevenirla, eliminando la transferencia embrionaria, lo cual implica la vitrificación de los embriones.

Pero, ¿Se ven afectadas las tasas de implantación y embarazo en estas pacientes? ¿Afectan los niveles de estradiol a la viabilidad y capacidad de implantación de los embriones?

OBJETIVOS

Determinar si los distintos niveles de estradiol en pacientes hiperestimuladas disminuyen la tasa de fecundación y afectan a la capacidad implantatoria embrionaria disminuyendo la tasa de éxito.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el estudio se han incluido 62 pacientes que presentaron síntomas de hiperestimulación durante el tratamiento de fecundación *in vitro*. Se pospuso la transferencia embrionaria y se

vitrificaron los embriones viables en D3 en sistema de Cryotop®.

Los embriones que fueron vitrificados eran de calidades A, B y C según los criterios de ASEBIR (Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción). En los 62 ciclos se llevó a cabo microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) o fecundación *in Vitro* (FIV), excluyendo aquellos pacientes con criptozoospermia, biopsia de testículo y semen de donante.

Para comparar la capacidad implantatoria en función del estradiol los pacientes se han dividido en 3 grupos. El primer grupo lo ocupan 24 pacientes con niveles de estradiol entre 1300-3000 pg/ml (Grupo 1) el segundo 19 pacientes con estradiol entre 3000-6000 pg/ml (Grupo 2) y el tercero 19 pacientes con estradiol entre 6000-11000 pg/ml (Grupo 3).

Los embriones fueron desvitrificados la misma mañana de la transferencia mediante el kit de desvitrificación de Kitazato®.

Para el análisis estadístico se ha utilizado SPSS (versión 17 para Mac).

RESULTADOS

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos 1, 2 y 3 en edad (32,46 vs 33,00 vs 34,16), número de ovocitos recuperados (19,96 vs 20,50 vs 23,79), número de embriones transferidos (2,04 vs 1,89 vs 1,89), tasa de fecundación (65,65% vs 64,08% vs 67,03%), tasa de implantación (31,25% vs 36,11% vs 28,95%) y tasa de gestación (54% vs 52% vs 42%) $p > 0,05$. Se encontraron diferencias significativas en el número de ovocitos maduros obtenidos (15,46 vs 18 vs 20,79) $p < 0,05$.

CONCLUSIONES

Aunque se han encontrado diferencias significativas en el número de ovocitos maduros, no es relevante, puesto que a mayor E2 sérico mayor número de ovocitos maduros.

Los niveles de estradiol, aunque sean altos, no reducen el potencial implantatorio de los embriones obtenidos durante ese ciclo. Tampoco disminuyen la tasa de fecundación ovocitaria. Por lo que vitrificar los embriones y transferirlos en un ciclo posterior sigue siendo la mejor estrategia para evitar el síndrome de hiperestimulación ovárica sin reducir la tasa de éxito.

029: ¿CUÁNDO INDICAR UN TESE POR ALTA TASA DE FRAGMENTACIÓN?

S. Camacho, M. De la Casa, V. Badajoz, MC. Cañadas, AR. Díaz, J. Gijón, J. Gragera, I. Lozano, L. Martínez, T. Sánchez, C. Urda, A. Martínez de Arenaza

GINEFIV

e-mail: s.camacho@ginefiv.com

INTRODUCCIÓN

La fragmentación del ADN espermático es un factor de gran importancia en la infertilidad masculina, aproximadamente el 25% de los hombres infértiles tienen

fragmentación de ADN elevada. Se ha estudiado que cuando el ADN de los espermatozoides está fragmentado, la tasa de fecundación del óvulo es menor y el número de ciclos de Reproducción Asistida fallidos mayor. Por todo ello,

es importante conocer el grado de la fragmentación del ADN espermático. El tratamiento oral con antioxidantes durante 3-6 meses puede ser eficaz en la reducción de la fragmentación del ADN espermático reduciéndola hasta un 20%,

pero en muchos casos no es suficiente, debido a que la fragmentación no es causada por un estrés oxidativo, sino que es debido a otros factores. A su vez, el grado de fragmentación del ADN en los espermatozoides de eyaculado es más alto que en los espermatozoides obtenidos de tejido testicular (1,2). Por todo ello, en ocasiones, se recomienda la realización de una biopsia de tejido testicular (TESE) el mismo día de la punción ovárica para mejorar los resultados de la microinyección, pero, ¿a partir de qué porcentaje de fragmentación debería indicarse?

OBJETIVOS

Determinar el grado de fragmentación a partir del cual mejoran los resultados de los ciclos de Reproducción Asistida tras la realización de una biopsia testicular al paciente el mismo día de la punción ovárica. Para ello, estudiaremos si hay diferencias significativas entre las tasas de fecundación, gestación, aborto e implantación entre ciclos con diferentes niveles de fragmentación espermática, tras la microinyección con espermatozoides procedentes de TESE el mismo día de la punción ovárica

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo, aleatorizado, de 25 ciclos de microinyección tras TESE realizados en el año 2010 en la Clínica Ginefiv. Se incluyen en el estudio pacientes con al menos un ciclo de RA fallido y que, tras realizarse un test de fragmentación del ADN espermático, para el cual el periodo de abstinencia fue inferior a 48 horas, éste dio valores superiores al 30% y que tras el tratamiento durante al menos 4 meses con antioxidantes, el valor de la fragmentación del ADN espermático sigue siendo patológico. Los ciclos estudiados tienen en común la realización de una biopsia testicular al paciente el mismo día de la punción ovárica, de manera que se microinyectan los ovocitos con espermatozoides procedentes del TESE. Se dividen los resultados obtenidos en 2 grupos: Grupo 1: pacientes con grado de fragmentación entre 30 y 40%. Grupo 2: pacientes con grado de fragmentación superior al 40% y se comparan estadísticamente los resultados.

RESULTADOS

	N	T. Fecund	T. Gest.Clin	T. Aborto	T. Implant
30-39% frg	10	59,1	20	0	10,5
>40% frg	15	**69,9	40	0	**26,7

(**= p-valor <0,05)

Al analizar estadísticamente los resultados, se observa que existen diferencias significativas tanto en la tasa de fecundación como en la de implantación de ambos grupos (59,1% vs 69,9% y 10,5% vs 26,7%). Respecto a la tasa de gestación, las diferencias no son significativas, tal vez debido al bajo número de casos, pero se observa un claro aumento de la misma (20% vs 40%) cuando el TESE se realiza en pacientes con marcado porcentaje de fragmentación.

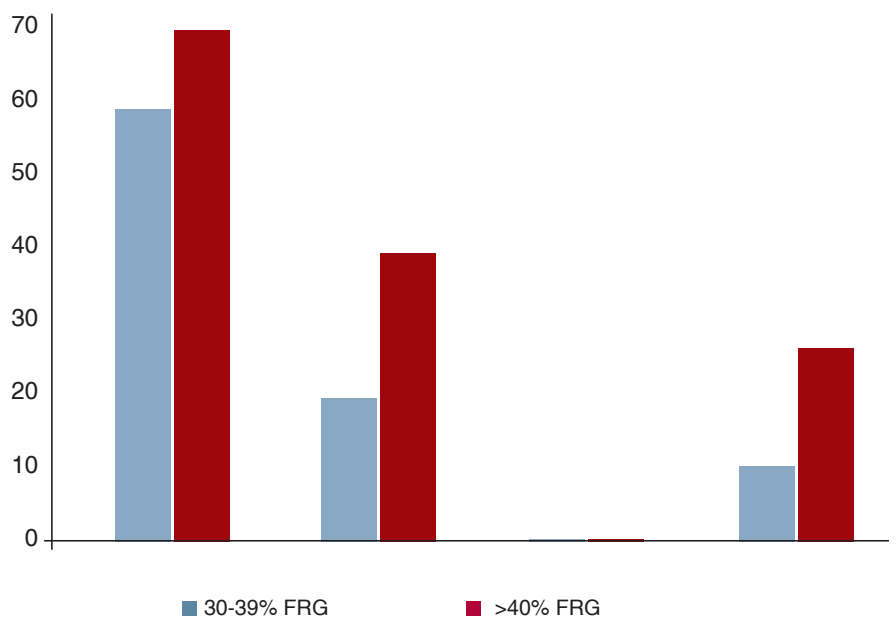
CONCLUSIONES

A la vista de los resultados, la realización de una biopsia testicular al paciente el mismo día de la punción ovárica de su pareja para la

obtención de espermatozoides para la microinyección, podría estar indicada en los casos de elevado porcentaje de fragmentación (superior al 40%).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, et al. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. **Hum Reprod.** 2005;20:226-230.
- 2.- Steele EK, McClure N, Maxwell RJ, Lewis SE. A comparison of DNA damage in testicular and proximal epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia. **Mol Hum Reprod.** 1999;5:831-835.



O30: TRANSFERENCIA DE EMBRIÓN ÚNICO. UNA REALIDAD

B. González, I. Herrero, I. Rossier, M.I. Rivas
Hospital Nuestra Señora de Fátima
e-mail: reproduccionasistida@hospitalfatima.nehos.com

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de FIV/ICSI son en la actualidad los tratamientos más exitosos para solventar los casos de infertilidad tanto masculina como femenina.

A pesar de las altas tasas de éxito que presentan estas técnicas, tanto el registro de Reproducción Asistida Europeo como el Americano hacen referencia al elevado índice de embarazos múltiples como consecuencia de estas técnicas.

Existen numerosas publicaciones en las que se hace referencia a un peor pronóstico en el desarrollo fetal y un mayor número de complicaciones obstétricas en niños resultantes de técnicas de reproducción asistida que en niños concebidos de manera espontánea y esto es debido principalmente al gran aumento de los embarazos múltiples.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio es determinar si la transferencia electiva de un único embrión es una estrategia a seguir con la finalidad de reducir las elevadas tasas de embarazo múltiple que existen en la actualidad en las pacientes sometidas a técnicas de Reproducción Asistida.

Al mismo tiempo, es importante determinar qué pacientes son candidatas a este tipo de transferencia para que al tiempo que se evita el embarazo múltiple, no se vean reducidas las tasas de embarazo evolutivo y niño en casa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se lleva a cabo una revisión de los ciclos realizados en el periodo desde Enero de 2010 a Marzo de 2011. Incluimos tanto ciclos de FIV/ICSI como ciclos de donación de ovocitos.

Calculamos también la tasa de embarazo acumulada con ciclos de congelación/descongelación.

En esta revisión incluimos aquellos ciclos en los que los pacientes tenían al menos 2 embriones de buena calidad en día +3, una edad igual o inferior a 37 años en los ciclos de ovocitos propios y era su primer o segundo ciclo.

Se excluyeron los ciclos en los que la transferencia de embrión único era por indicación médica.

Todas las transferencias se realizaron en día+3.

RESULTADOS

Se seleccionaron 30 ciclos de FIV/ICSI y 50 ciclos de donación de ovocitos.

Los resultados obtenidos se exponen en las siguientes tablas:

	FIV/ICSI
Número de ciclos	30
Media de edad ± SD (años)	33,1±2,8
% Tasa de fecundación	85,4
Tasa de B-HCG positiva (%)	16/30 (53,3)
Tasa de embarazo (%)	16/30 (53,3)
Tasa de implantación (%)	16/30 (53,3)
Tasa de aborto (%)	3/16 (18,7)
Tasa de embarazo acumulada (%)	22/30 (73,3)
Tasa de embarazo múltiple (%)	0/30 (0)

Tabla 1. Estadística ciclos de FIV/ICSI

	FIV/ICSI
Número de ciclos	50
Media de edad ± SD (años)	41,7±3,9
% Tasa de fecundación	82,1
Tasa de B-HCG positiva (%)	27/50 (54)
Tasa de embarazo (%)	24/50 (48)
Tasa de implantación (%)	24/50 (48)
Tasa de aborto (%)	1/24 (4,1)
Tasa de embarazo acumulada (%)	30/50 (60)
Tasa de embarazo múltiple (%)	0/50 (0)

Tabla 2. Estadística ciclos de donación de ovocitos

CONCLUSIÓN

A pesar de que el número de ciclos incluidos no es muy elevado, sí que

nos permite observar que la tasa de embarazo es muy aceptable y disminuimos al 0% la tasa de embarazo múltiple.

Es importante hacer una buena selección de las pacientes candidatas a transferencia de embrión único para no disminuir la tasa de embarazo.

031: EXPRESIÓN DE LA MOLÉCULA DE ADHESIÓN DEL ESPERMATOZOIDE 1 (SPAM1) EN LA TROMPA DE FALOPIO

O. S. Acuña, C. Moros, E. Rodríguez, F. Meseguer, M.J. Izquierdo-Rico, L. Fernández-González, P. Coy y M. Avilés.
Dpto. Biología Celular e Histología Facultad de Medicina Universidad de Murcia
e-mail: maviles@um.es

La fecundación y el desarrollo embrionario temprano *in vivo* tienen lugar en la trompa de Falopio. En ese órgano se encuentra un fluido de naturaleza compleja, cuya composición no es del todo conocida, que interactúa con los gametos y el embrión. La identificación de los componentes de este fluido implicados en la fecundación y desarrollo embrionario puede ser de gran utilidad para el diseño y mejora de los medios de cultivo empleados en las técnicas de fecundación *in vitro*. El presente estudio se centra en la identificación de uno de estos componentes, la proteína de adhesión del espermatozoide 1 (SPAM1). La penetración del espermatozoide a través del *cumulus oophorus* y la interacción del espermatozoide con la zona pelúcida (ZP) del ovocito son algunos de los acontecimientos esenciales para que la fecundación tenga lugar. La molécula de adhesión del espermatozoide 1 (SPAM1) también conocida como PH20 es una glicoproteína presente en la superficie del espermatozoide y ampliamente conservada en los mamíferos. SPAM1 es multifuncional. Así, posee actividad hialuronidasa a pH neutro, capacidad de unión a la ZP y capacidad de señalización del calcio asociado a la reacción acrosómica. Inicialmente se consideró que la expresión y síntesis

de esta glicoproteína era exclusiva del tracto genital masculino (testículo y epidídimo); sin embargo, estudios realizados en ratón, demostraron que también es sintetizada en el tracto genital femenino (vagina, útero y oviducto). En la especie humana se ha descrito la expresión de SPAM1 en testículo, epidídimo y conducto deferente. Dado el papel relevante desempeñado por esta proteína en diferentes mamíferos, nos planteamos determinar la expresión génica de SPAM1 en la trompa de Falopio. La muestra se obtuvo mediante salpinguectomía bilateral en el transcurso de una histerectomía abdominal total con doble anexectomía por útero miomatoso de una paciente mujer de 49 años, en fase folicular, en la que al momento de la extracción de la muestra se visualizó un folículo pre-ovulatorio en el ovario izquierdo. Una vez fuera del campo quirúrgico, la muestra fue transportada hasta el laboratorio donde se seccionó la zona ampular de la trompa contralateral del ovario izquierdo que fue la incluida en este estudio. Tras la extracción de ARN total del tejido ampular, el ADNc obtenido se utilizó como molde para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando como referencia la secuencia de SPAM1 humano (NM_001174044.1).

Se diseñó un cebador directo (3´-GGGTAAACCAAAGTGTGTAGG-5´) y uno reverso (3´-GCAACTTCCATTGTAACCGG-5´), para llevar a cabo la amplificación. El producto obtenido correspondió a un fragmento de 771 pb, que coincide con el tamaño del producto esperado. El producto de PCR fue secuenciado y analizado por BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La secuencia del producto amplificado tuvo una identidad máxima de 100% con la secuencia de referencia. Concluimos que la transcripción de SPAM1 no solo es en testículo y epidídimo, sino también en la trompa de Falopio. Este hecho implica que la trompa de Falopio podría estar involucrada en cambios a nivel de los gametos masculino y femenino participando en procesos como la maduración oviductal del espermatozoide, además de la maduración epididimaria. Esta proteína podría estar involucrada igualmente en la disgregación del *cumulus oophorus in vivo*. Son necesarios más estudios para investigar el papel de SPAM1 expresado en el tracto reproductor femenino. Estudio financiado por Fundación Séneca de la Región de Murcia (0452/GERM/06) y el Ministerio de Ciencia e Innovación y el FEDER (AGL2009-12512-C02-01-02).

032: MEJORA DE LA TASA DE GESTACIÓN MEDIANTE LA TÉCNICA DE SEPARACIÓN MAGNÉTICA EN MUESTRAS DE SEMEN CONGELADAS UTILIZADAS EN CICLOS DE DONACIÓN DE OVOCITOS

MS Carchenilla¹, D. Agudo¹, M. Alonso¹, P. Sanjurjo¹, D. Becerra¹, F. Bronet¹, JA García-Velasco^{1,2} A. Pacheco^{1,3}
¹IVI Madrid, Avenida del Talgo 68, 28023 Madrid ²Universidad Rey Juan Carlos, Madrid, ³ Universidad Alfonso X, Madrid.
e-mail: marta.sancelestino@ivi.es

INTRODUCCIÓN

La criopreservación de semen en una técnica cada vez más utilizada en los

tratamientos de reproducción asistida. El inconveniente reside en el daño funcional y en la inducción del proceso de apoptosis en los espermatozoides

que puede generar esta técnica, influyendo por tanto en la tasa de gestación. Por otro lado, las técnicas de capacitación espermática como el

swim-up y los gradientes de densidad, no son efectivas a la hora de eliminar los espermatozoides apoptóticos y de aquellos que tienen el ADN fragmentado. Ésta podría ser la razón de la disminuida tasa de gestación en los tratamientos de reproducción asistida en los que se utiliza semen congelado.

Recientemente se ha desarrollado un nuevo método para aislar magnéticamente células que reaccionan frente a la Anexina V. Se trata de una técnica no invasiva utilizada para reducir el porcentaje de espermatozoides apoptóticos de una muestra de semen.

OBJETIVOS

El objetivo de este estudio fue analizar la utilidad de la técnica MACS (*magnetic activated cell sorting*) para mejorar la tasa de gestación en ciclos de reproducción asistida en los que se utilice muestra de semen congelado.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se utilizaron muestras de semen congeladas tanto de pacientes como de donantes. Después de la descongelación, las muestras fueron capacitadas mediante gradientes

de densidad y posteriormente se incubaron (excepto las muestras control) con Anexina V MicroBeads durante 30 minutos en oscuridad. Tras la incubación se realizó la separación magnética con MACS y la muestra eluida se utilizó para realizar el ICSI. Todos los ciclos incluidos en el estudio fueron ciclos de donación de ovocitos para así poder descartar el factor femenino como posible causa de infertilidad.

Para analizar la fragmentación de ADN espermático y el porcentaje de espermatozoides Anexina V positivos (apoptóticos) se recogieron 3 alícuotas de semen (muestra descongelada, capacitada y tras ser pasada por la columna (elución)).

Para determinar el porcentaje de Anexina V/IP, las muestras se incubaron con Anexina V- FITC durante 15 minutos. Tras la incubación se lavaron y resuspendieron en 0,5 ml de Binding Buffer. La fragmentación de ADN espermático se determinó mediante la técnica TUNEL utilizando el kit comercial (Roche) y siguiendo el protocolo de la casa comercial. Ambos porcentajes, fragmentación de ADN y Anexina V se analizaron por citometría de flujo (FACScan). El estudio estadístico

se realizó con el programa SPSS, considerándose valores significativos a $p < 0.05$.

RESULTADOS

En el estudio se incluyeron 56 muestras de semen congeladas (35 de pacientes y 21 de donantes). Todas las muestras se descongelaron siguiendo el mismo protocolo y se capacitaron mediante gradientes de densidad. 28 muestras (controles) se utilizaron directamente en los ciclos de ICSI y 27 muestras (población de estudio) siguieron el protocolo de separación magnética antes de realizar el ICSI. En ambos casos, la media de embriones transferidos fue similar (1,8). La tasa de gestación en los ciclos realizados con las muestras control fue de 45,8% mientras que la tasa en ciclos con muestras separadas mediante MACS incrementó a un 58,3%.

CONCLUSIONES

La separación magnética de espermatozoides podría ser una buena técnica para mejorar la tasa de gestación en aquellos ciclos de reproducción asistida en los que se utilicen muestras de semen congeladas.

O33: RESULTADOS CLINICOS PRELIMINARES CON EMBRYOSCOPE

J. Muñoz, A. Silván, C. Zonza, M. Brandt, J.L. García Fernández, L. García Bernardo, E. Garijo, F. Galera.
Instituto Madrileño de Fertilidad (IMF)
e-mail: jmunoz@imfertilidad.com

INTRODUCCIÓN

Evaluar los resultados de la utilización de un incubador *time-lapse*: el EmbryoScope (Unisense, Fertilitech).

MATERIAL Y MÉTODOS

El EmbryoScope está dotado de una cámara infrarroja que fotografía 9 planos de cada embrión cada 30 minutos sin necesidad de sacar los mismos del incubador, por tanto, conseguimos mantener estables las condiciones de cultivo. Durante los meses de marzo y abril de 2011 se cultivaron en nuestro EmbryoScope 32 pacientes en placas

de 12 pocillos con medio Global (Life Global) cubiertas de aceite mineral Lite Oil (Life Global) y con un 6 % de CO₂.

Tras la microinyección se lavaron los ovocitos en una placa de gotas con medio Global y posteriormente se colocaron de uno en uno en cada pocillo de la placa de EmbryoScope. Si la transferencia se realizó en día 3, los embriones se sacan justo antes de la transferencia; si la transferencia se realizó en día 5, los embriones se cambian a una placa nueva en el día 3.

Se realizó la prueba de embarazo 15 días después de la punción y 10 días más

tarde se confirmó el embarazo clínico mediante ecografía vaginal.

RESULTADOS

La edad media fue de $37 \pm 4,4$ años, $9,85 \pm 4,2$ ovocitos en punción, $7,6 \pm 3,5$ MII, $6,1 \pm 3,2$ fecundados, $1,8 \pm 0,7$ embriones transferidos y $2,7 \pm 2,6$ vitrificados.

Gracias a la visualización de los embriones podemos ver la hora media post-fecundación de: aparición de pronúcleos ($8,0 \pm 2,6$ horas), desaparición de pronúcleos ($23,9 \pm 9,8$ horas), división en 2 células ($25,9 \pm 3,2$ horas), división

en 4 células ($38,8 \pm 6,1$ horas) y división en 8 células ($58,1 \pm 7,5$ horas). No se observaron diferencias en estos parámetros de división embrionaria entre los embriones de buena calidad (A y B de ASEBIR) y embriones de media o mala calidad (C y D).

La prueba de embarazo fue positiva en un 71,8% de los casos (23/32), 77,3% en pacientes de ovocitos propios (17/22) y 60 % en pacientes de Ovodonación (6/10).

De estos 32 casos, sólo en 25 transcurrió tiempo suficiente para hacer la ecografía y confirmar presencia de saco. Las tasas de embarazo clínico fueron de un 52 % (13/25), 47,1% en ovocitos propios (8/17) y 62,5% en receptoras de ovocitos (5/8).

CONCLUSIONES

Los resultados clínicos observados en estas pacientes cuyos embriones fueron cultivados en el EmbryoScope

parecen indicar una mejora en las tasas de embarazo propiciada por el mantenimiento de las condiciones de cultivo en este tipo de incubador sumado a la optimización de la selección embrionaria conseguida con la monitorización.

034: DETERMINACIÓN DE ANOMALÍAS EN LA FECUNDACIÓN DE OVOCITOS FUERA DEL PERIODO DE OBSERVACIÓN DE PRONÚCLEOS MEDIANTE LA TECNOLOGÍA *TIME-LAPSE*

J. Aguilar, E. Táboas, M. Mollá, M. Ojeda, E. Muñoz
IVI Vigo
e-mail: jesus.aguilar@ivi.es

INTRODUCCIÓN

La valoración de la fecundación de los ovocitos inseminados, bien mediante fecundación in vitro (FIV) o mediante microinyección espermática (ICSI), es un proceso fundamental para determinar la correcta fecundación de los mismos, y evitar de ese modo la transferencia de embriones aneuploides. Tradicionalmente se ha valorado la fecundación entre las 17 y 20 horas post-inseminación, considerando un ovocito correctamente fecundado aquel que en esa franja horaria, presenta 2 pronúcleos (PN) en el citoplasma y 2 corpúsculos polares (CP) en el espacio perivitelino. Tras esta valoración, la siguiente observación de los preembriones se realiza a las 27h post-inseminación y se valora la división temprana, habiendo desaparecido los PN para este momento en la mayoría de los casos. Cualquier anomalía en el número de PN que se produjese fuera de esta franja horaria de las 17-20h, quedaría pues sin ser evaluada.

El objetivo de este estudio, es determinar la utilidad del incubador EmbryoScope, en la valoración de anomalías en la fecundación de los ovocitos fuera de ese rango de las 17-20h.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio descriptivo de 47 casos de ICSI durante el periodo de enero a mayo de 2011, en el que los ovocitos microinyectados fueron incubados durante todo su desarrollo embrionario in vitro en el incubador EmbryoScope, el cual permitió la monitorización de todo el desarrollo embrionario gracias a la tecnología *time-lapse* que permite visualizar imágenes de los ovocitos y preembriones cada 20 minutos, sin alteraciones en la temperatura y concentración de CO₂ de los mismos.

RESULTADOS

Se obtuvieron un total de 447 ovocitos de las 47 pacientes sometidas a la punción folicular.

Un total de 349 ovocitos en estadio de metafase II (MII) fueron microinyectados.

260 ovocitos fueron fecundados normalmente (74,7%) y 12 tuvieron una fecundación anómala (4,6%).

9 preembriones, los cuales en el rango horario de entre las 17 y 20 horas post-fecundación fueron valorados como

embriones con fecundación normal, experimentaron la aparición de un tercer PN fuera de ese rango horario. 8 de ellos se desarrollaron hasta día 3 y fueron catalogados como 2 embriones tipo A, 2 tipo B, 2 tipo C, y 2 tipo D de acuerdo con la clasificación de ASEBIR.

CONCLUSIONES

La aparición de anomalías en la fecundación fuera del rango de las 17-20h, puede no ser valorada en el cultivo embrionario en incubadores tradicionales, y existir la posibilidad de transferir embriones aneuploides a la paciente.

La incubación de los preembriones en el EmbryoScope permite una valoración mucho más exhaustiva de la fecundación embrionaria al poder observar los acontecimientos nucleares y citoplasmáticos que suceden en el preembrión fuera del rango tradicional de valoración de los mismos, sin comprometer su viabilidad ni alterar las condiciones de temperatura y concentración de CO₂ del cultivo.

O35: DETERMINACIÓN DE LOS TIEMPOS EXACTOS DE LOS PRINCIPALES EVENTOS DEL DESARROLLO EMBRIONARIO UTILIZANDO CINEMATOGRAFÍA *TIME-LAPSE* EN 1340 EMBRIONES HUMANOS

J. Herrero¹, M. Cruz², A. Tejera¹, I. Rubio¹, J. L. Romero¹, M. Meseguer¹.

¹IVI Valencia, Laboratorio de FIV, Valencia, España. ²IVI Alicante, Laboratorio de FIV, Valencia, España.

e-mail: javier.herrero@ivi.es

INTRODUCCIÓN

La adquisición de imágenes mediante la tecnología *time-lapse* es un método que aplicado a los laboratorios de reproducción asistida permite determinar con precisión parámetros cinéticos durante el desarrollo embrionario. Hasta donde sabemos, éste es el trabajo con el mayor número de embriones analizados mediante este procedimiento. Por primera vez es posible establecer la morfocinética embrionaria a través del registro continuado de los tiempos exactos de los principales sucesos desde el momento de la fecundación hasta el estadio de blastocisto.

OBJETIVO

Determinar con exactitud los momentos en que ocurren los eventos que tienen lugar durante el desarrollo embrionario preimplantatorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las imágenes de los embriones se tomaron de forma continua cada 15 minutos utilizando un incubador tri-gas con una cámara incorporada y diseñada para la adquisición automática de imágenes (EmbryoScope™, Unisense

FertiTech, Aarhus, Denmark). Cada imagen es captada en 5 planos focales diferentes en tiempo real, analizándose hasta un máximo de 72 embriones simultáneamente, correspondientes a 6 placas independientes. El tiempo de cada evento se registró en horas tras la microinyección. Gracias a un programa de procesamiento de imágenes con un visor de alta resolución se registraron todos los eventos embrionarios para los análisis estadísticos posteriores.

Se monitorizó el desarrollo de 1340 embriones obtenidos mediante ICSI de 210 parejas incluidas en nuestro programa de donación ovocitaria desde septiembre de 2009 hasta noviembre de 2010. El único criterio de exclusión para estas parejas fue la presencia de factor masculino severo (con un recuento espermático de menos de 5 millones de espermatozoides móviles progresivos totales en el eyaculado). Los criterios de inclusión para las donantes fueron tener entre 18 y 35 años, no estar ni haber estado expuestas a ningún tipo de agente radiactivo o a sustancias químicas nocivas, no ser consumidoras de tóxicos y no presentar historiales familiares de patologías cromosómicas hereditarias, teniendo cariotipos normales. Todas las donantes tenían ciclos menstruales normales de 26 a 34 días de duración,

peso normal (IMC 18-28 kg/m²) y no estuvieron sometidas a tratamiento endocrino (incluyendo gonadotropinas y anticonceptivos orales) en los 3 meses precedentes al estudio.

RESULTADOS

La tabla 1 presenta los valores mínimos, máximos y la media, con los intervalos de confianza, para cada evento analizado: divisiones desde el estadio de cigoto a embrión de 8 células, compactación en la transición a mórula y formación del blastocisto.

CONCLUSIONES

La captura de imágenes seriadas mediante tecnología *time-lapse* aplicada a la embriología, nos ha permitido por primera vez asentar con seguridad y objetividad las bases de la cronología del desarrollo embrionario. El presente estudio contiene el mayor tamaño muestral analizado hasta el momento con este sistema, aportando información consistente y exacta sobre la distribución de los eventos que tienen lugar desde la microinyección hasta el estadio de blastocisto. En breve, estos avances harán posible usar el *timing* embrionario como un nuevo criterio de selección con objeto de mejorar los resultados clínicos.

Variable	Media	IC 95%		Mínimo	Máximo
		Límite inferior	Límite Superior		
1ª división (a 2 células)	26,10	25,47	26,73	20,40	35,56
2ª división (a 3 células)	36,27	35,35	37,19	24,08	44,45
3ª división (a 4 células)	38,02	37,05	38,99	24,74	48,23
4ª división (a 5 células)	48,95	47,56	50,33	35,64	64,44
5ª división (a 6 células)	52,05	50,78	53,32	39,55	66,41
6ª división (a 7 células)	54,39	53,01	55,77	39,55	69,75
7ª división (a 8 células)	58,41	56,82	60,01	39,55	73,08
Compactación mórula	85,61	84,80	86,42	70,22	99,65
Formación blastocisto	97,68	96,65	98,71	79,94	115,65

Tabla 1. Valores medios, mínimos, máximos e intervalos de confianza

036: RESULTADOS PRELIMINARES DE LA APLICACIÓN DE LOS ARRAYS DE CGH COMO TÉCNICA DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL

F. Marina¹, N. Pérez¹, N. Fosas¹, A. Carrasco¹, M. Sandalinas², E. García-Guixé², A. Jiménez-Macedo², C. Giménez² y S. Marina¹

¹Instituto de Reproducción CEFER. ANACER, ²Reprogenetics, España.

e-mail: info@institutocefer.com

INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios corroboran el hecho de que muchos embriones provenientes de ciclos de FIV presentan anomalías cromosómicas. Actualmente el método de Diagnóstico Genético Preimplantacional utilizado para detectar estos embriones y evitar su transferencia al útero era el *screening* de aneuploidías para 5, 9 o 12 cromosomas mediante FISH. La técnica de hibridación genómica comparada con *arrays* (aCGH) permite analizar todos los cromosomas y aumentar así la probabilidad de transferir embriones cromosómicamente normales.

OBJETIVOS

El objetivo es mostrar nuestros resultados obtenidos en ciclos de ICSI en los que se ha realizado un ciclo de DGP utilizando la técnica de aCGH.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los embriones de parejas que acuden al centro de reproducción asistida por

diferentes indicaciones (abortos de repetición, edad materna avanzada, fallos repetidos de implantación, concepciones previas con aneuploidías y/o factor masculino) fueron biopsiados en día +3 de desarrollo in vitro. Los blastómeros (1 blastómero por embrión) fueron dispensados en tubos de PCR donde fueron sometidos al proceso de amplificación total del genoma (WGA). Posteriormente se procedió al marcaje fluorescente e hibridación sobre *arrays* de BAC. El análisis de los perfiles obtenidos se realizó a través de un escáner InnoScan 710AL (Innopsys). La transferencia de los embriones normales se realizó en día +5.

RESULTADOS

Se han realizado 8 casos de ICSI con DGP mediante aCGH desde abril de 2010. Se han biopsiado un total de 35 embriones, obteniéndose diagnóstico en 34 de ellos (97,14%). Catorce embriones fueron diagnosticados como normales (41,18%), 12 presentaban aneuploidías (monosomías totales o

parciales, o trisomías) (35,29%) y 8 fueron anormales complejos (23,53%). Se han realizado 6 transferencias (75%) con una media de 2 embriones transferidos. La tasa de embarazo por transferencia resultó en un 33,3%, con una tasa de implantación del 25%. Si en estos embriones se hubiese realizado un DGP para 5 cromosomas, se hubieran detectado el 55% de los embriones anormales. Si se hubiera realizado un DGP de 9 cromosomas se hubieran detectado el 85% de los embriones con anomalías.

CONCLUSIONES

Según nuestros resultados, la técnica de aCGH permite diagnosticar casi la totalidad de los embriones biopsiados. Los *arrays* de CGH permiten detectar un mayor número de anomalías y descartar más embriones anormales que con los métodos empleados hasta ahora. La técnica de aCGH muestra en la actualidad ser una técnica de utilidad clínica.

037: EFECTO DE LOS ENDOCANABINOIDES, 2-ARAQUIDONILGLICEROL (2-AG) Y 2-ARAQUIDONILGLICEROL ÉTER (2-AGE), EN LAS FUNCIONES IN VITRO DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS

M.M. Francou, E. García-Hernandez, J.L. Girela, M.J. Gómez-Torres, J. Ten, R. Bernabeu, J. De Juan
Departamento de Biotecnología, Universidad de Alicante
e-mail: manuelafrancou@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Los cannabinoides son los componentes biológicos activos de la planta de marihuana "*cannabis sativa*". Naturalmente, existen cannabinoides sintetizados por diferentes

tejidos del organismo llamados "endocannabinoides". Estos son un grupo de ácidos poliinsaturados que median sus efectos uniéndose a dos tipos de receptores: receptor de cannabinoide tipo-1 (CB1) y tipo-2 (CB2). Los endocannabinoides más importantes

son el 2-araquidonilglicerol (2-AG), 2-araquidonilglicerol éter (2-AGE) y la anandamida (AEA). Estos juegan un rol importante en la regulación de las funciones reproductivas, tanto femeninas como masculinas. Así, en espermatozoides humanos, la AEA

reduce la motilidad progresiva e induce la reacción acrosómica espontánea. Sin embargo, en otras especies como peces y toros provoca una inhibición de la reacción acrosómica. Debido a que el efecto del 2-AG y 2-AGE no ha sido establecido en células espermáticas, su estudio permitiría conocer la influencia de estos endocannabinoides en las funciones *in vitro* de los espermatozoides humanos.

OBJETIVO

El principal objetivo de este trabajo fue determinar los efectos que tiene la exposición del 2-AG y 2-AGE en la motilidad, viabilidad y reacción acrosómica de espermatozoides humanos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio fueron analizadas 10 muestras de donantes normozoospermicos (25-35 años), según los criterios de la OMS (Organización Mundial de la Salud, 2010). Alícuotas de cada muestra fueron incubadas independientemente con diferentes concentraciones de 2-AG

o bien de 2-AGE: 10 nM, 100nM, 1 μ M, 10 μ M y 100 μ M. También se realizó un control negativo, sustituyendo el endocanabinoide por PBS. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se evaluó la viabilidad, motilidad y reacción acrosómica de cada alícuota. La viabilidad se realizó mediante la técnica eosina-negrosina. La motilidad se analizó en un microscopio de contraste de fases, clasificando los espermatozoides en motiles progresivos (MP), motiles no progresivos (MNP) y no motiles (NM). La reacción acrosómica espontánea fue evaluada mediante la técnica de FITC-PSA y analizada en un microscopio de epifluorescencia LEICA DMRB.

RESULTADOS

Los efectos de ambos endocannabinoides fueron observados en la concentración más alta (100 μ M). El 2-AGE (100 μ M) tiene un efecto tóxico sobre los espermatozoides, disminuyendo significativamente ($p < 0,05$) su viabilidad con respecto al control. Sin embargo, en todas las concentraciones estudiadas, el 2-AG no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad espermática.

Los espermatozoides que sufrieron reacción acrosómica de forma espontánea aumentaron un 33% con el 2-AG (100 μ M) y un 55 % con el 2-AGE (100 μ M), respecto al control ($p < 0,05$). Por otra parte, cuando los espermatozoides fueron expuestos al 2-AG no se observaron diferencias significativas entre los MP, MNP y NM. No obstante, el 2-AGE (100 μ M) disminuyó los MP (68%) y aumentó los NM (50%) respecto al control.

CONCLUSIONES

El 2-AG y 2-AGE influyen de manera diferente en las funciones *in vitro* de los espermatozoides humanos. Las altas concentraciones de 2-AGE producen un efecto tóxico sobre los espermatozoides, causando una disminución de los mótiles progresivos y un aumento de los no mótiles. Además, ambos endocannabinoides 2-AG y 2-AGE aumentan la reacción acrosómica espontánea. Nuestros resultados sugieren que los endocannabinoides afectan a los principales patrones seminales, pudiendo reducir la capacidad fecundante de los espermatozoides.

038: DIFERENCIAS EN LA CINÉTICA EMBRIONARIA ENTRE CICLOS DE FIV E ICSI

M. Roldán, M. Martínez, B. Gadea, M. Cruz, M. Meseguer, M. Muñoz, I. Pérez-Cano
IVI Alicante
e-mail: mariaroldan82@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Los embriones que evolucionan dentro de unos rangos de tiempo determinados presentan mayor tasa de desarrollo a blastocisto y potencial implantatorio.

El *timing* de división junto a la morfología embrionaria se consideran indicadores del potencial de desarrollo y se aplican con éxito en los programas de FIV-ICSI para la selección embrionaria.

El uso del EmbryoScope®, que integra la captura de imágenes mediante tecnología de *time-lapse* y el cultivo embrionario, permite examinar

de forma no invasiva la cinética embrionaria.

OBJETIVOS

Estudiar, utilizando el EmbryoScope®, las diferencias en la cinética embrionaria entre ciclos de FIV e ICSI; desde la hora de realización de la técnica hasta la llegada al estadio de blastocisto.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se evaluaron 782 embriones procedentes de 125 ciclos de donación de ovocitos, desde el 29/7/2009 hasta el 31/3/2011 en la clínica IVI Alicante.

Los ovocitos procedentes de ICSI se metieron en el EmbryoScope® después de realizar la técnica (día 0), mientras que los ovocitos inseminados mediante FIV se introdujeron tras ser decumulados (día 1). En ambos grupos se consideró el tiempo 0 (T0) al momento en el que se realizó el FIV/ICSI.

Los parámetros analizados en el *timing* de división embrionaria fueron: desaparición de los pronúcleos (DPN), división a 2 células (T2), 3 células (T3), 4 células (T4), 5 células (T5), 6 células (T6), 7 células (T7), 8 células (T8), mórula (M), blastocisto (B) y blastocisto expandido (BE).

Posteriormente analizamos los tiempos en alcanzar dichos estadios estableciendo el T0 en el momento de la desaparición de los pronúcleos.

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante un test ANOVA, $p < 0.05$.

RESULTADOS

Existen diferencias estadísticamente significativas entre las primeras divisiones embrionarias (Tabla 1), siendo el *timing* para DPN, T2 y T3 mayor en embriones de FIV (DPN= 25.22 ± 0.15 , T2= 28.19 ± 0.17 , T3= 40.11 ± 0.28) que de ICSI (DPN= 23.82 ± 0.17 , T2= 26.9 ± 0.17 , T3= 38.94 ± 0.35).

La dispersión en los datos de los tiempos de división obtenidos resultó menor en estos primeros estadios,

incrementándose notablemente a partir de T4 en ambos grupos.

Cuando se evaluaron los tiempos transcurridos entre cada división, considerando T0 la desaparición de los pronúcleos, no se observaron diferencias significativas entre los grupos.

CONCLUSIONES

El uso del EmbryoScope® permite determinar, de forma continuada y no invasiva, los tiempos de división embrionaria mediante la tecnología de *time-lapse*.

Existen diferencias significativas en los tres primeros estadios (DPN, T2 y T3) cuando T0 corresponde al momento del FIV/ICSI. Estas diferencias se atribuyen al desfase de tiempo, por las propias

condiciones fisiológicas de ambas técnicas, y que sufren los gametos inseminados mediante FIV con respecto a los de ICSI.

El análisis de los tiempos transcurridos entre cada división, cuando se consideró T0 el momento de la desaparición de los pronúcleos, demostraría que los embriones de ambos grupos se comportan de manera similar en su división.

Los resultados obtenidos muestran rangos de tiempo muy similares, para la desaparición de pronúcleos y divisiones hasta T3, en los embriones procedentes de ambos tratamientos. Sin embargo, en las divisiones posteriores a T3, la mayor dispersión de los datos evidencia que el rango de tiempo en el que ocurre la división es mayor.

Tiempos de División	FIV (n=401)	ICSI (n=381)	p
DPN	25,22±0,14*	23,81±0,16*	0,00
T2	28,19±0,17*	26,90±0,16*	0,00
T3	40,10±0,28*	38,94±0,35*	0,01
T4	41,74±0,26	41,18±0,44	0,27
T5	54,52±0,56	53,07±0,66	0,09
T6	58,26±0,64	56,86±0,71	0,14
T7	63,69±0,82	61,42±0,88	0,06
T8	70,26±1,00	69,88±1,13	0,80
M	91,55±0,61	91,82±0,57	0,76
B	103,49±0,64	103,93±0,61	0,62
BE	117,44±1,18	114,64±3,03	0,30

Tabla 1. * diferencias estadísticamente significativas, test Anova $p < 0,05$

039: EXPERIENCIA ACUMULADA EN EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

M. Martínez-Fresno, A. Gómez Duro, P. Eibes Peteiro, A. Sotillo, E. Fernández
Geniality Diagnóstico Genético
e-mail: mmfresno@geniality.es

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Huntington (EH) es un trastorno neurodegenerativo del sistema nervioso central con herencia autosómica dominante y penetrancia completa, causada por la expansión del trinucleótido "CAG" repetido en el gen

IT15 (4p16.3). La prevalencia media en la población general es de 6,2/100.000 siendo la edad de manifestación entre la tercera y cuarta década de vida, dependiendo del nº de repeticiones de la expansión, con una perspectiva de vida tras el diagnóstico de 15 a 20 años.

Debido a la sintomatología, la falta de tratamiento y el mal pronóstico de los enfermos, individuos a riesgo de padecer la EH no desean conocer su condición de portadores de la enfermedad, pero desean tener descendencia sin riesgo. Por ello, nuestro equipo realiza dos tipos de estudios, directos e indirectos.

En los estudios directos se analiza la expansión del trinucleótido en el ADN de las blastómeras así como una amplia batería de marcadores tipo *short tandem repeat* (STRs) colindantes a la mutación (ver Tablas II y III). En los estudios indirectos, uno de los miembros de la pareja tiene el 50% de riesgo de tener Huntington pero no desea conocer su condición, por lo que sólo se analizan los STRs con el fin de seleccionar aquellos embriones que no hayan heredado el haplotipo de riesgo.

OBJETIVO

Diseño de una metodología diagnóstica usando una amplia batería de STRs que permita, biopsiando una única célula embrionaria, mejorar las tasas de embrión diagnosticado y solventar incidencias que ocurren en la amplificación de una sola célula como son el *Allele Drop-Out* (ADO) y el fallo de amplificación total.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo en un total de 21 ciclos de fecundación in vitro para el DGP de Huntington en 12

familias. En todos los ciclos se emplearon entre 6 y 9 STRs para el estudio de informatividad, seleccionando aquellos informativos o semi-informativos, y entre 4 y 6 STRs para el DGP. Únicamente un ciclo fue cancelado antes de llegar a biopsia. Los ciclos se han agrupado en estudios directos e indirectos. Se analizaron 199 blastómeras de un total de 119 embriones biopsiados (Tabla I). A todas las blastómeras se les realizó, después de la lisis celular, la técnica de *Multiple Displacement Amplification* (MDA) con el fin de amplificar todo el genoma completo y poder posteriormente estudiar en una sola reacción (PCR-multiplex) los marcadores seleccionados para cada una de las familias y la mutación en los casos directos.

RESULTADOS

De un total de 119 embriones se analizaron 199 blastómeras biopsiadas (Tabla I), obteniendo diagnóstico en 117 embriones (98,3%). Al comparar ambos grupos vemos que aunque no existen diferencias estadísticamente significativas entre la tasa de embriones sin diagnóstico ($p=0,2124$

$=0,05$), la tasa de embarazo global es 33,3%, siendo del 50% en el grupo de estudios directos vs 20% en estudios indirectos (Tabla I), esta diferencia puede deberse a que la media de embriones transferidos es 1,6 en el caso de estudios indirectos y 2,1 en directos, sin embargo el tamaño de la muestra no permite un análisis estadístico robusto.

CONCLUSIONES

La amplia batería de STRs permite realizar DGP tanto directos como indirectos, con una alta tasa de embrión diagnosticado, 100% y 96% respectivamente, solventando problemas como el ADO inherentes a la metodología empleada en DGP (MDA y PCR-multiplex en una única célula). Al 66% de los embriones de este estudio se le analizaron dos células, práctica habitual en el DGP de enfermedades monogénicas. Sin embargo, la tasa de embrión diagnosticado, del 100%, obtenida mediante esta metodología en aquellos embriones donde se biopsió una sola célula (44%), nos ha permitido descartar la biopsia de una segunda célula.

Tabla I

	Estudio Indirecto	Estudio Directo	Total
Número de Ciclos	12	9	21
Número de Ciclos cancelados	1 (8,3%)	0	1 (4,76%)
Número de Embriones Biopsiados	55	64	119
Número de Embriones con 1 célula biopsiada	18	22	40
Número de Embriones con 2 célula biopsiadas	36	42	78
Número de Embriones con 3 célula biopsiadas	1	0	1
Número de Células analizadas	92	107	199
Número de Embriones sin diagnóstico	2 (3,6%)	0	2 (1,7%)
Número de Embriones sanos	18 (32,7%)	27 (42,2%)	45 (37,8%)
Número de Embriones afectos	-	37 (57,8%)	37 (31,1%)
Número de Embriones con riesgo	35 (63,6%)	-	35 (29,4%)
Número de Embriones transferidos	16	17	30 (1,6)
Número de Transferencias	10	8	18
Transferencia 1 Embrión	5 (50%)	1 (12,5%)	6 (33,3%)
Transferencia 2 Embriones	4 (40%)	5 (62,5%)	9 (50%)
Transferencia 3 Embriones	1 (10%)	2 (25%)	3 (16,7%)
Tasa de embarazo por transferencia	20%	50%	33,30%

Tabla II

STR	Posición respecto al locus	Distancia al locus	Blastómeros analizados	Tasa de ADO
D4S449	Upstream	2,33 Mb	7	14,50%
D4S2936	Upstream	2,32 Mb	17	42,03%
D4S3038	Upstream	1,97 Mb	7	0%
D4S127	Upstream	0,037 Mb	113	22%
D4S126	Upstream	0,023 Mb	86	31%
I1CAHD	Downstream	Intrón 1	72	31,30%
D4S3034	Downstream	0,080 Mb	113	35,20%
D4S412	Downstream	0,135 Mb	171	25,70%
D4S2957	Downstream	0,587Mb	5	0%
W1388	Downstream	1,43 Mb	17	16,60%
D4S2375	Downstream	1,72 Mb	10	0%
D4S394	Downstream	3,71 Mb	20	33,30%

Tabla III

Expansión	Posición respecto al locus	Distancia al locus	Blastómeros analizadas	Tasa de ADO
HD2	Exón 1	-	83	34,07%
HD4	Exón 1	-	53	53,32%

040: ANÁLISIS DE LA ESPECIE-ESPECIFICIDAD DE LA REACCIÓN ACROSÓMICA EN ESPERMATOZOIDES MURINOS MEDIANTE EL USO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS DE ZP3 HUMANO-RATÓN

M. T. Zomeño-Abellán¹, M. A. Ramírez², A. Gutiérrez-Adán², J.C. Martínez³, J. Landeras³, J. Ballesta¹, M. Avilés¹.

¹Universidad de Murcia, Departamento de Biología Celular e Histología, Murcia, España. ²INIA Madrid, Madrid, España. ³IVI-Murcia, Murcia, España. e-mail: teresazome@um.es

INTRODUCCIÓN

La zona pelúcida (ZP) del ratón está compuesta por tres glicoproteínas, ZP1, ZP2 y ZP3. De las cuales ZP3 está descrita como receptor primario del espermatozoide capacitado e inductor de la reacción acrosómica (RA). La RA es un proceso especie-específico, y aún no se conoce con exactitud el mecanismo molecular responsable de la inducción de la RA mediada por ZP. Aunque las glicoproteínas ZP3 humana (hZP3) y ZP3 murina (mZP3) tienen una identidad aminoacídica del 67%, difieren en gran medida en su patrón de glicosilación. En la región N-terminal de mZP3 existe un *cluster* de O-glicosilación que no está presente en hZP3. Mientras que en la región C-terminal ambas glicoproteínas

están glicosiladas, esta glicosilación es diferente. Con el fin de discernir si los dominios N- y C-terminales de mZP3 están involucrados en la inducción de la RA en el ratón, se crearon dos proteínas quiméricas de ZP3 utilizando diferentes regiones de la proteína humana y murina, y se evaluó su actividad mediante ensayos de RA.

MATERIAL Y MÉTODOS

El cDNA de hZP3 (amablemente donado por el Dr. Dean, NIH, USA) y el cDNA de mZP3 (Invitrogen) se subclonaron en un plásmido pEGFP-N1 (Clontech). A partir de éstos se subclonaron las dos nuevas glicoproteínas. La primera proteína quimérica (m-hZP3) contenía la región N-terminal de mZP3 (M1-L47)

y el resto de la secuencia de hZP3. La segunda proteína quimérica (h-mZP3) contenía la región C-terminal de mZP3 (F269-Q424). Las construcciones hZP3, m-hZP3 y h-mZP3 se transfectaron en células CHO. Las muestras seminales fueron aisladas de la cola epididimaria de siete ratones CD1, capacitadas mediante *swim-up* en HTF suplementado con 4g/l de BSA durante 1h a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa. Los ensayos de RA se llevaron a cabo a una concentración de 1-10 x 10⁶ espermatozoides/ml, incubando durante 1h con las tres glicoproteínas recombinantes secretadas por las células CHO (100µg/ml), ZP solubilizada murina (20µg/ml) y progesterona (10µM). La evaluación de la RA se realizó mediante el uso de la lectina

procedente de *Arachis hypogaea* unida a isocianato de fluoresceína (PNA-FITC) (Sigma).

RESULTADOS

Mediante *western-blot* se determinó el peso molecular aproximado de las glicoproteínas recombinantes hZP3, m-hZP3 y h-mZP3, y de la ZP solubilizada murina; siendo 55 kDa, 60 kDa, 64 kDa y 83 kDa respectivamente. El medio de cultivo que contenía m-hZP3 y h-mZP3 produjo la RA en espermatozoides murinos en un porcentaje de 57% ± 2,09 y 56,6% ± 2,33 respectivamente. Este

resultado es muy similar al porcentaje de espermatozoides reaccionados mediante progesterona (59,2% ± 3,56) y ZP solubilizada de ratón (53,8% ± 1,24), con los que no presentaban diferencias significativas. Sin embargo, sí presentaban diferencias significativas con el porcentaje de espermatozoides reaccionados de manera espontánea (29,6% ± 2,54) y con el grupo tratado con hZP3 (35,6% ± 3,17).

CONCLUSIÓN

Las proteínas quiméricas m-hZP3 y h-mZP3, poseen una actividad biológica

similar a la ZP solubilizada murina, y sin embargo hZP3 no posee esta actividad sobre los espermatozoides murinos. Estos resultados sugieren que al menos una de las dos regiones (N-terminal y C-terminal) de mZP3 insertada en hZP3 es suficiente para la inducción de la RA en espermatozoides murinos. Esto implica que la especie-especificidad se ha podido establecer a nivel de dos regiones de la proteína ZP3.

Estudio financiado por la Fundación Séneca de la Región de Murcia 0452/GERM/2006 y IVI-Murcia.

041: HATCHING ASISTIDO LOCALIZADO EN TRANSFERENCIA DE BLASTOCISTOS CRIOPRESERVADOS

D.Gumbao¹, B. Amorcho¹, D. López¹, A.Sánchez¹, J. Marcos¹, J. Landeras².
¹Laboratorio FIV, IVI Murcia, Murcia, Spain, ²Unidad de Ginecología, IVI Murcia, Murcia, Spain
 e-mail: david.gumbao@ivi.es

INTRODUCCIÓN

La implantación de los embriones en el endometrio uterino es un proceso fundamental para que tenga lugar la gestación. Pero para ello, el embrión desarrollado hasta el estadio de blastocisto, debe escapar a la zona pellucida (ZP) mediante el denominado *hatching* o eclosión embrionaria. Diferentes técnicas incorporada en los últimos años en las TRA tratan de simular este proceso in vitro, lo que se conoce como *Hatching* asistido (HA), aunque no parece estar totalmente claro el resultado que esta técnica pueda tener en los resultados en ciclos de FIV-ICSI-TE.

OBJETIVOS

Valorar los resultados preliminares obtenidos a partir de la transferencia embrionaria de blastocistos criopreservados de ciclos incluidos en programa de ovodonación a los que previamente a la transferencia se realizó HA, diferenciando cuando el HA se realizó a nivel de la MCI o bien a nivel de trofoectodermo (TRF) con el fin de evidenciar diferencia alguna.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio tuvo lugar en la clínica IVI Murcia entre Noviembre 2009 y Febrero 2011 a partir de 22 embriones

procedentes de ciclos de FIV-ICSI-TE incluidos en el programa de ovodonación, cuya transferencia se realizó en día cinco de desarrollo embrionario siendo sometidos previamente y de forma randomizada a HA por adelgazamiento (zona *thinning*) mediado por láser en la zona correspondiente a la MCI o del TRF una vez que tuvo lugar la reexpansión de los mismos y siendo transferidos el mismo día. Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente (Test Fisher p<0.5) con el fin de evidenciar diferencias significativas entre ambos grupos.

RESULTADOS

	HA MCI	HA TRF	
n	11	11	
Edad	38.8 ± 5.9	38.7± 5.6	
T. Gestación	90.9	54.6	0.149
T. Implantación	80.0*	37.5*	0.029

Tabla 1. Resultados obtenido. *diferencia estadísticamente significativa. Test Fisher p<0.05

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos se muestran a favor de realizar el HA a nivel de MCI,

especialmente a la hora de incrementar las tasas de implantación en pacientes incluidas en programas de ovodonación, lo que parece estar en consonancia

con los resultados obtenidos por otros grupos que defienden el papel de la MCI en el proceso de *hatching* embrionario.

042: CORRELACIÓN ENTRE MORFOLOGÍA EMBRIONARIA Y ANEUPLOIDÍAS EN D4 E IMPLANTACIÓN EN D5, EN UN PROGRAMA DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL (DGP)

A. Delgado, L. Escrich, A. Mercader, P. Buendía, V. Peinado, M. Meseguer
IVI Valencia
e-mail: arantza.delgado@ivi.es

INTRODUCCIÓN

La evaluación de la morfología embrionaria sigue siendo la herramienta de mayor peso en el laboratorio en cuanto a selección de embriones para transferir se refiere, si bien, está ampliamente documentado que una buena morfología no siempre corresponde con un embrión euploide, ni con un embrión que implantará y dará lugar a una gestación.

OBJETIVOS

El propósito de este estudio es analizar la morfología embrionaria en D4-D5 y su correlación con aneuploidías e implantación respectivamente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo de 1.352 embriones del programa de DGP. Las pacientes fueron tratadas para distintas indicaciones: aborto de repetición, edad materna avanzada, fallo de implantación, factor masculino severo y causas mixtas. La biopsia embrionaria se realizó en D3 y los embriones fueron cocultivados individualmente sobre una monocapa de células endometriales. El análisis se realizó mediante hibridación

in situ fluorescente (FISH) para los cromosomas 13,15,16,17,18,21,22, X e Y. Los embriones fueron divididos en categorías según el estadio en D4-D5. D4: A (células); B (mórula); C (blastocisto). D5: A (blastocisto temprano); B (blastocisto cavitado); C (blastocisto expandido); D (blastocisto *hatching*); E (blastocisto *hatched*). Mediante regresión logística se calculó el efecto de la morfología embrionaria sobre las aneuploidías en D4 y sobre la implantación en D5. Después de introducir las distintas categorías en el modelo, se obtuvo una predicción que fue comparada con el resultado real y evaluado con análisis de curvas ROC. El valor predictivo del modelo fue definido con el área bajo la curva (IC95) proporcionado por el análisis ROC. Para la estadística se utilizó el programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) y Medcalc Software.

RESULTADOS

Las comparaciones estadísticas fueron establecidas mediante regresión logística y la significancia del modelo se calculó con el ómnibus test (*like hood ratio*). Las Odds ratio del efecto de cada estadio en D4-D5 se expresaron con un

95% de intervalo de confianza. Las Odds ratio fueron las siguientes:

D4: A=2.857 (1.943-4.202) B=4.207 (2.876-6.155) C=8.665 (5.006-14.997). $p=0,0001$. El área bajo la curva fue de 0.651 (0.548-0.575).

D5: A=2.715 (1.384-5.324) B=4.244 (2.102-8.569) C=5.092 (2.120-12.233) D=5.991 (3.285-10.926) E=7.834 (2.244-27.350) $p=0,0001$. El área bajo la curva ROC fue de 0.658 (0.618-0.698).

CONCLUSIONES

Muchos embriones aneuploides presentan una morfología óptima y podrían ser seleccionados para la transferencia embrionaria. Mediante el análisis de regresión logística se observa una mayor incidencia de anomalías cromosómicas en embriones de desarrollo subóptimo en D4, así como una mayor tasa de implantación en estadios más avanzados de desarrollo en D5. A pesar de estos resultados, los parámetros morfológicos no son suficientes para evitar transferir embriones aneuploides, ni para aumentar de forma significativa las tasas de implantación. De cualquier manera, la morfología es un parámetro complementario útil para mejorar la selección y los resultados de los ciclos de DGP.

043: ESTUDIO DE LA SEGREGACIÓN CROMOSÓMICA EN UNA PORTADORA DE UNA TRANSLOCACIÓN RECÍPROCA T(1;10) (P12;P11.2)

G. Daina^{*1,2}, M. Rius^{*1}, L. Ramos¹, J. del Rey¹, J. Benet^{1,2}, J. Navarro^{1,2}, O. López³, A. Mata³, A. García³, L. Bassas³, JR. Bordás⁴, O. Martínez-Pasarell³
*Los dos primeros autores contribuyeron por igual en este trabajo

¹Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Facultat de Medicina, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra. ²Càtedra de Recerca Eugén-UAB, Barcelona. ³Laboratori de Seminologia i Embriologia, Fundació Puigvert Barcelona. ⁴Programa de Reproducció Assistida, Fundació Puigvert-Hospital de Sant Pau, Barcelona
e-mail: gemma.daina@uab.es

INTRODUCCIÓN

Los individuos portadores de translocaciones recíprocas pueden

generar un 20-80% de gametos desequilibrados dependiendo de los cromosomas implicados y el tamaño de los fragmentos intercambiados. El

Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) está indicado para evitar la transmisión a la descendencia de reorganizaciones en forma

desequilibrada. Las tasas de embarazo por ciclo de DGP en portadoras de translocaciones recíprocas no alcanzan el 15% (ESHRE PGD Consortium X). Es posible que los embriones transferidos presenten aneuploidías en cromosomas que no se analizan, pudiendo impedir su implantación en el útero materno.

Por otro lado, en ciclos de FIV la hiperestimulación ovárica con dosis elevadas de gonadotropinas podría favorecer la presencia de aneuploidías en los ovocitos obtenidos. Recientemente, se ha aplicado la técnica de maduración *in vitro* de ovocitos (MIV) para intentar obtener mejores resultados sobre todo en casos de mujeres con ovario poliquístico.

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue el estudio de la segregación cromosómica en material descartado de una portadora de una translocación recíproca, con el fin de estudiar no solo los desequilibrios derivados de la translocación, sino también todos los cromosomas del complemento. Para ello se aplicó la Hibridación Genómica Comparada (CGH).

MATERIAL Y MÉTODOS

Paciente de 30 años de edad, cariotipo 46,XX, t(1;10)(p12;p11.2) y respuesta elevada a la estimulación ovárica. Se le practicó un ciclo de MIV en el que fue

posible estudiar el primer corpúsculo polar (1CP) de los ovocitos y dos ciclos de FIV con análisis de blastómeros. En todos ellos, el estudio citogenético de todos los cromosomas se realizó tanto en 1CP como en blastómero aplicando la técnica de CGH rápida.

RESULTADOS

Del ciclo de MIV se estudiaron 8 1CPs, 4 de ellos fueron normales o equilibrados resultantes de una segregación alternante (50%), y los otros 4 fueron desequilibrados: 3 originados a partir de una segregación adyacente 1 (37,5%) y 1 de una segregación adyacente 2 (12,5%). No se observaron aneuploidías de cromosomas no implicados en la translocación.

De los ciclos de FIV se analizaron 25 embriones. Se observaron 10 embriones equilibrados resultantes de una segregación alternante (40%), y 15 embriones desequilibrados (60%): 4 de ellos que provenían de una segregación adyacente 1 (16%), 5 de una segregación adyacente 2 (20%) y 6 de una segregación 3:1 (24%).

Adicionalmente, en 9 de los 25 embriones (36%) se observaron aneuploidías de cromosomas no implicados en la translocación (cromosomas 4, 11, 12, 16, 17, 19, 22, X e Y). El análisis con CGH también ha permitido la detección de pérdidas o ganancias de fragmentos cromosómicos

en 3 embriones (12%), involucrando los cromosomas 3, 4, 12 y X.

CONCLUSIONES

La aplicación de la CGH ha permitido estudiar la segregación cromosómica en una translocación recíproca t(1;10) en 1CP y en blastómero, además de detectar otras anomalías numéricas y estructurales. El porcentaje de células observadas con segregación desequilibrada entra en el rango descrito anteriormente (20-80%).

Se observa presencia de anomalías no ligadas a la translocación en los embriones procedentes de ciclos de FIV y no en ovocitos obtenidos de maduración *in vitro*. Hay que tener en cuenta que en el estudio de 1CP las anomalías observadas son maternas, mientras que en el blastómero pueden tener origen ovocitario, espermático o embrionario. Por otro lado, la estimulación hormonal aplicada en ciclos de FIV podría inducir la aparición de aneuploidías y otras anomalías cromosómicas, aunque sería necesario el estudio de un mayor número de casos para poder llegar a conclusiones definitivas.

AGRADECIMIENTOS

FIS-ISCI III (PI080012), Grup de Suport a la Recerca, Generalitat de Catalunya (2009SGR1107), Càtedra de Recerca Eugeni-UAB, Beca Fundació Crèdit Andorrà.

044: ¿CÓMO AFECTA LA INCUBACIÓN IN VITRO A LA FUNCIONALIDAD DEL ESPERMATOZOIDE HUMANO?

E.M. García, S. Lozano, M.J. Gómez-Torres, LL. Medrano-López, J. De Juan
Departamento de Biotecnología. Universidad de Alicante
e-mail: em.garcía@ua.es

INTRODUCCIÓN

Existen diversos estudios que sugieren que la función espermática se ve alterada en espermatozoides capacitados tras periodos prolongados de incubación *in vitro*. El parámetro más afectado parece ser la motilidad, aunque también se ve alterada la viabilidad

y la fragmentación del ADN. Por otra parte, hay autores que muestran que los espermatozoides incubados *in vitro* pueden sufrir reacción acrosómica espontánea en bajas proporciones. Sin embargo, hasta el momento no se ha concretado si estos cambios siguen el mismo patrón en espermatozoides en fresco y tras capacitación.

OBJETIVO

Evaluar los efectos sobre la viabilidad, motilidad, estado del acrosoma, fragmentación del ADN y alteraciones morfológicas tras 24, 48, 72 y 96 horas de incubación *in vitro* a 5% de CO₂ y a 37°C, antes y después de la capacitación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio fueron utilizadas muestras seminales procedentes de 10 varones sanos voluntarios. Las muestras fueron procesadas en el Departamento de Biotecnología de la Universidad de Alicante y fueron clasificadas como normozoospermicas según la OMS (2010). Cada muestra fue dividida en dos alícuotas. Una de ellas fue capacitada, mediante *swim-up* e incubada en medio HAM F-10 en los diferentes tiempos, mientras que la otra alícuota fue incubada en fresco bajo las mismas condiciones. En cada uno de los tiempos de incubación se analizó el porcentaje de fragmentación del ADN mediante la técnica TUNEL, la integridad del acrosoma mediante la lectina FITC-PSA, así como la motilidad y la viabilidad. Las muestras fueron, además, analizadas mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) con el fin de comprobar los

posibles daños a nivel de membrana, acrosoma, pieza intermedia y flagelo.

RESULTADOS

Tras 24 horas de incubación se observó un descenso significativo tanto en la motilidad como en la viabilidad en muestras en fresco y capacitadas. Por otro lado, el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado se duplicó entre las 24 y las 48 horas de incubación. Este aumento significativo se observó en muestras en fresco y en capacitado.

Cuando se valoró la reacción acrosómica, se observó un aumento del porcentaje de espermatozoides con el acrosoma alterado entre las 24 y las 48 horas de incubación. No se obtuvieron diferencias significativas entre las muestras en fresco y capacitadas, en ninguno de los tiempos de incubación. Al estudiar las muestras, tanto en fresco

como en capacitado mediante MEB, las imágenes obtenidas corroboran los daños descritos anteriormente. A partir de las 24 horas observamos en el 90% de las células analizadas, rotura de membrana plasmática y acrosomales y presencia de vesículas alrededor de la cabeza, producto de la liberación del contenido acrosomal. A nivel del cuello se observaron fisuras y piezas intermedias desorganizadas. A lo largo del flagelo observamos una posible desorganización de las fibras densas.

CONCLUSIÓN

A partir de las 24 horas todos los biomarcadores espermáticos analizados se ven afectados de la misma forma antes y después de la capacitación, por lo que el plasma seminal no evita la pérdida de funcionalidad en el espermatozoide durante una incubación *in vitro* prolongada.

045: ¿QUÉ APORTA LA IMSI EN LOS CASOS DE FACTOR MASCULINO SEVERO?

M. Sánchez de Burgos, M. Morales Morales, L. Andrés Criado, M. Cuadros, M^a Ángeles Manzanares, E. Ricciarelli, J. Cuadros
Clínica de Medicina de la Reproducción y Ginecología FIVMadrid
e-mail: jcuadros@fivmadrid.es

INTRODUCCIÓN

Desde que en 1992 se introdujo la ICSI, ésta ha resultado ser el método de elección para tratar la infertilidad de origen masculino. La selección de espermatozoides para la microinyección se lleva a cabo basándose en la motilidad y en la morfología, teniendo en cuenta cola, cuello y cabeza. Esta selección se lleva a cabo a 400x (objetivo de 40x). Sin embargo, espermatozoides aparentemente normales a ese aumento pueden tener anomalías estructurales que sólo se pueden detectar si utilizamos aumentos mayores que los de la ICSI. A raíz de esto surge la MSOME (Selección morfológica por las organelas de los espermatozoides móviles), técnica que permite seleccionar espermatozoides por la ausencia de vacuolas en el núcleo, en nuestro caso utilizando la óptica

de Nomarski con un objetivo de 60x con aceite de inmersión, que permite alcanzar un aumento final de 6800x.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio retrospectivo es valorar si existe una mejora en las tasas de fecundación, embarazo e implantación con la inyección de espermatozoides morfológicamente seleccionados (IMSI), basada en MSOME, versus la ICSI tradicional en los casos de oligoastenoteratozoospermia severa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio se ha llevado a cabo de Enero a Diciembre de 2010. Los criterios de selección de los pacientes fueron similares en ambos grupos: factor

masculino severo, mujeres menores de 40 años, 3 o más ovocitos en MII en la punción.

El grupo control en el cual se realizó ICSI incluye 23 pacientes con una media de edad de 34,4 años. El grupo estudio en el que se realizó IMSI incluye 23 pacientes y una media de edad de 34,1 años. Los parámetros a valorar fueron la tasa fecundación, la tasa de gestación clínica, la tasa de implantación y los abortos. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test de Chi-cuadrado.

RESULTADOS

No se observó diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros evaluados.

	Tasa fecundación	Emb.clinico	Tasa implantación	Aborto
IMSI	67,7%	43,5%	22,4%	10%
	(95/141)	(10/23)	(11/49)	(1/10)
ICSI	67,6%	52,2%	30,4%	8,3%
	(134/198)	(12/23)	(14/46)	(1/12)

DISCUSIÓN

Este estudio demuestra que tanto la IMSI como la ICSI convencional dan lugar a unos resultados clínicos similares en los casos de factor masculino severo.

Esto nos lleva a pensar, para estudios posteriores, que quizás podría existir otro grupo de pacientes a los que les beneficiase más esta técnica, como es el caso de pacientes con 2 o más fallos de ICSI o en abortadoras de repetición.

046: ESTUDIO PRELIMINAR: EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS DE CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA SOBRE EL ÍNDICE DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

I. Panisello¹, T. Planella², C. Vives², P. Feliu², Ll. Arola³, I. Saumell²

¹ Alumna en prácticas de la Universitat Rovira i Virgili. ² Embriogyn, Centre de Reproducció Humana Assistida. ³ Profesor de la Facultat de Química de la Universitat Rovira i Virgili de Tarragona.
e-mail: isaumell@embriogyn.com

INTRODUCCIÓN

La determinación del índice de fragmentación del ADN (IF) espermático junto con el seminograma básico puede aportar más especificidad para conocer el origen de la esterilidad de un paciente y, así, indicar la técnica de reproducción asistida más adecuada.

Es conocido que la transferencia del ADN íntegro desde el espermatozoide al óvulo puede ser esencial para conseguir una gestación con éxito. Tanto es así que desde el punto de vista del laboratorio de andrología, existen diferentes estudios sobre la repercusión de la capacitación espermática en la integridad del ADN espermático. Algunos estudios, apuntan a una disminución de la fragmentación del ADN espermático después de la capacitación según la técnica de laboratorio utilizada.

OBJETIVOS

El objetivo de este estudio es valorar el efecto de los diferentes tratamientos de capacitación espermática sobre el índice de fragmentación del ADN en las muestras de semen para FIV e FIV-ICSI y, a la vez, relacionarlo con la tasa de gestación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realiza un estudio preliminar, prospectivo con 7 muestras de semen dentro del programa de Fecundación *in vitro* de Embriogyn. Se valora el IF del ADN a los 20 minutos de la obtención de la muestra (IF basal) y después de ser capacitado, justo antes de su utilización en FIV convencional o ICSI, (IF capacitado). Las técnicas de capacitación utilizadas son:

LAVADO SEMINAL

Se utiliza toda la muestra, añadiendo G-IVF+ Vitrolife® s.V (37°C / 6%CO₂) en volumen 1:1 y se homogeneiza. Se centrifuga 10 minutos a 1400 rpm y se rechaza el sobrenadante. El *pellet* se resuspende con 0,2 ml del mismo medio y se incuba hasta el momento de su utilización.

GRADIENTES DE DENSIDAD

A las columnas de gradientes de densidad (95% y 50%) SpermGrad /G-IVF+ Vitrolife® s.V se añade 1ml de semen. Se centrifuga la columna durante 20 minutos a 1200 rpm. El *pellet* se transfiere a un tubo con 4 ml de G-IVF+ (37°C / 6%CO₂) centrifugando 10

minutos a 1500 rpm. Al *pellet* se añade 0,5 ml del mismo medio y se incuba hasta el momento de su utilización.

Para analizar el IF aplicamos el paquete comercial de Halosperm® basado en la tecnología SCD, (*Sperm Chromatin Dispersion*) el cual permite la descondensación diferencial de la cromatina entre aquellos espermatozoides que presentan su ADN fragmentado respecto a aquellos que lo mantienen intacto. Efectuamos las lecturas en microscopio óptico de contraste de Hoffman visualizando un mínimo de 500 espermatozoides.

Para estudiar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los IF (basal y capacitado) se utiliza la prueba t de comparación de dos medias, corregida para muestras pequeñas.

RESULTADOS

En todos los casos, el IF basal es inferior al 30% (no patológico). Los resultados obtenidos muestran de forma estadísticamente significativa ($t=3,26$; $p<0,05$) que los tratamientos de capacitación espermática permiten obtener espermatozoides con un menor IF (\bar{X} IFcapacitado = 2,56%) que antes

de ser capacitados (\bar{X} IFbasal= 11,6%). En relación a las gestaciones obtenidas, de los 7 ciclos de FIV estudiados se obtiene gestación clínica en 5 de éstos (71,42%).

CONCLUSIONES

Este estudio pretende orientar hacia un nuevo trabajo más profundo y extenso

sobre el efecto que tiene la manipulación *in vitro* de los espermatozoides antes de su utilización en TRHA.

Aunque el número de muestras estudiadas es muy reducido, sorprende a la luz de los resultados obtenidos, que el IF capacitado es realmente muy bajo. Así pues, entendemos que gracias a los protocolos específicos de capacitación

espermática en el laboratorio de andrología se consiguen seleccionar espermatozoides con mejor integridad de ADN. Es pronto para poder relacionar el IF con las tasas de gestación por lo que es evidente que será necesario ampliar la muestra estudiada y así dar veracidad a los resultados obtenidos.

047: LA IMPORTANCIA DE LA BAJA CONCENTRACIÓN DEL CRIOPROTECTOR EN LA CONGELACIÓN CELULAR. CONGELACIÓN LENTA VS VITRIFICACIÓN VS ULTRA-VITRIFICACIÓN DE ÓVULOS

E. Criado, C. González, H. R. Benito
CERAM. Centro de reproducción de Marbella.
e-mail: ecriados@yahoo.es

INTRODUCCIÓN

Actualmente existen dos técnicas para la conservación celular: el enfriamiento lento y la vitrificación.

El enfriamiento lento o *slow freezing* está basado en el control de la tasa de enfriamiento con el objetivo de crear un equilibrio entre los distintos factores que causan daño celular, entre los que se encuentran la formación de hielo, fracturas y una excesiva deshidratación de la célula. Está caracterizada por la baja concentración de crioprotectores y por la curva de enfriamiento.

La vitrificación es un proceso mediante el cual un líquido se solidifica en una fase vítrea con un descenso rápido de la temperatura y un aumento de la viscosidad, evitando así la formación de cristales intracelulares que pueden dañar el contenido celular. Existen varias formas de conseguir la vitrificación, pasando todas ellas por el empleo de una alta concentración de agentes crioprotectores (etilenglicol, dimetilsulfóxido, 1,2-propanodiol, etc.) llegando incluso a concentraciones de hasta 6M en algunos protocolos. Dichas concentraciones de crioprotectores resultan muy tóxicas para la célula.

La técnica de Ultra-Vitrificación, desarrollada en los últimos años,

consigue un aumento en la velocidad de enfriamiento, llegando hasta 250.000°C/min aproximadamente evitando así la formación de cristales de hielo que dañen la célula. Para esto se utiliza un sistema de micro-capilares de cristal de cuarzo y nitrógeno líquido *Slush*. Como consecuencia de estos nuevos componentes tenemos la posibilidad de disminuir la concentración de los crioprotectores a 2M (concentración poco tóxica para la célula) aumentando la tasa de supervivencia, de fecundación y de desarrollo del embrión después de la descongelación del óvulo.

OBJETIVOS

Demostrar la eficacia de una nueva técnica de Ultra-vitrificación celular que nos permite ultra-vitrificar óvulos humanos con velocidades de enfriamiento ultra-rápidas permitiéndonos usar bajas concentraciones de crioprotectores típicas de *Slow freezing*. De esta manera podemos disminuir la toxicidad de éstos y mejorar las tasas de supervivencia, fecundación y de desarrollo embrionario.

MATERIAL Y MÉTODOS

Como solución refrigerante se usa el nitrógeno *Slush*, mucho más frío

que el nitrógeno líquido (-196°C Vs -210°C) y con la propiedad de evitar el efecto *Leiderfrost*.

Para aumentar la transmisión de temperatura y minimizar el volumen se utiliza un microcapilar de cristal de cuarzo. Éste tiene un diámetro de 0.2-0.3 mm permitiendo ultra-vitrificar 0.1-0.2 µl con una pared de 0.01 mm de grosor, mucho más fina que cualquier otro sistema (0.075 *Open Pulled Straw*). Pero la característica más importante es que la conductividad térmica del cuarzo es mucho más elevada que la del plástico del que están hechos los otros sistemas de congelación. Esto lo convierte en uno de los materiales que mejor transmite la temperatura.

La técnica de Ultra-vitrificación permite utilizar una concentración "no tóxica" para la célula: 2M de PrOH+0.5 Sacarosa. Obteniendo un 92% de supervivencia en óvulos maduros humanos.

RESULTADOS

Hemos analizado y comparado la tasa de supervivencia, de fecundación y de blastulación con distintas técnicas de congelación en distintos artículos científicos publicados recientemente por Cao YX et al., 2009 (1), Ho-Joon Lee et al., 2010 (2) y E Criado et al., 2011 (3).

Según estos estudios, utilizando la técnica de *Slow freezing* se obtiene un 61% de tasa de supervivencia, un 61.3% de tasa de fecundación y un 12% de tasa de blastulación (1). Con la técnica de Vitriificación se obtiene un 91.8%, un 67.9% y un 33.1% respectivamente (1). Utilizando esta nueva técnica de Ultravitrificación con baja concentración de crioprotector en óvulos maduros de ratón se han obtenido un 92.5% de tasa de supervivencia, un 75% de tasa de fecundación y un 59.1% de tasa de blastulación (2). En los últimos

estudios realizados utilizando esta nueva técnica con óvulos maduros humanos se ha obtenido un 92% de tasa de supervivencia (3).

CONCLUSIONES

Esta técnica es una nueva opción para preservar óvulos humanos obteniendo una elevada tasa de supervivencia. Todo indica, según los resultados obtenidos en óvulos de ratón, que ultravitrificando con baja concentración de crioprotector se obtiene casi el

doble de tasa de blastulación con el consiguiente beneficio y eficacia a la hora de transferir esos embriones. No obstante estos estudios se tienen que realizar en óvulos humanos y ver si ese 92% de tasa de supervivencia es una "supervivencia morfológica" o una "supervivencia funcional". Esta nueva técnica puede ser uno de los primeros pasos para alcanzar la congelación celular sin sustancias crioprotectoras simplificando, mejorando y abaratando las técnicas de criopreservación celular.

048: ¿TIENEN FECHA DE CADUCIDAD LOS PREEMBRIONES CRIOPRESERVADOS?

B. Sánchez, J. Guardiola, M.D. Lozano, S. Borrego, G. Antiñolo
 Unidad de gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal. Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla
 e-mail: beasanchandujar@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

El número de preembriones criopreservados en los centros de reproducción humana asistida, así como el tiempo que permanecen almacenados, ha aumentando progresivamente como consecuencia del mayor número de ciclos realizados, mejores resultados obtenidos y la tendencia a disminuir el número de preembriones transferidos. Por ello, y desde que la nueva ley de reproducción humana asistida en España permite mantener los preembriones criopreservados hasta que finalice la edad reproductiva de la paciente, es interesante comprobar si el tiempo de almacenamiento influye negativamente en su viabilidad y capacidad de implantación.

OBJETIVO

Analizar si el tiempo de almacenamiento de los preembriones criopreservados de un programa de FIV afecta negativamente a la supervivencia embrionaria tras la descongelación, la capacidad de implantación y la tasa de embarazo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Análisis retrospectivo de 909 ciclos de descongelación embrionaria realizados entre Enero de 2007 y Junio de 2010. Se han descongelado 2543 embriones pertenecientes a pacientes del programa de FIV-ICSI de nuestra Unidad que se habían realizado el ciclo entre 1998 y 2010, analizando 5 periodos de tiempo de almacenamiento. La media de edad de las pacientes y el número

de embriones transferidos fue similar en todos los periodos de almacenamiento. Los preembriones se congelaron siguiendo un protocolo de congelación lenta (propanodiol y sacarosa como agentes crioprotectores) con un congelador programable por ordenador (Minicool 40PC) y se descongelaron mediante descongelación rápida. Sólo se criopreservaron preembriones considerados con calidad suficiente. Consideramos embarazo clínico la observación ecográfica de saco gestacional con latido fetal 6-7 semanas post-transferencia. Para el análisis estadístico se utilizó el test χ^2 o el test exacto de Fischer cuando fue necesario. La significación estadística se estableció en $p < 0,05$.

RESULTADOS

Periodo de almacenamiento (Días)	20-100	101-365	366-730 (1-2 años)	731-1095 (2-3 años)	> 1095 (> 3 años)	p
Nº ciclos de descongelación	328	390	71	65	55	
Edad paciente	34	34.5	35	34	34.5	
Nº de embr descongelados	924	1071	211	164	173	
Tasa de supervivencia	66.5	70.5	71	72.5	57.8	0.008
Nº de transferencias	290	341	63	59	47	
Nº de embr transferidos	1.7	1.7	1.8	1.7	1.9	
% Emb Clínico/ Transf	15,5 (n= 45)	17 (n= 58)	25,4 (n= 16)	18,6 (n= 11)	19,1 (n= 9)	0,445
% Aborto	20 (n= 9)	44,9 (n= 26)	56,2 (n= 9)	27.3 (n= 3)	22 (n= 2)	
% Implantación	9.7	11.5	14.2	11.9	13.3	0.608
% Nacidos vivos/Transf	12,4 (n= 36)	9,4 (n= 32)	11,1 (n= 7)	13.6 (n= 8)	14,9 (n= 7)	0,640

De las 16 transferencias con preembriones de más de 5 años, se obtuvo embarazo clínico y nacido vivo sano en dos de ellas, en ambos casos los preembriones llevaban criopreservados 7 años. Se observan diferencias estadísticamente significativas en la tasa de supervivencia. Respecto a la tasa de aborto, el análisis estadístico no fue posible debido al reducido número de casos en los dos últimos periodos. No hay diferencias estadísticamente

significativas entre los distintos periodos de almacenamiento analizados, en la tasa de embarazo clínico, en la tasa de implantación, y en la tasa de nacido vivo.

CONCLUSIONES

Aunque el tiempo de almacenamiento de los preembriones criopreservados parece influir negativamente en la tasa de supervivencia, los preembriones

que sobreviven mantienen la misma capacidad para implantar, dar lugar a un embarazo clínico y a un niño sano, sin afectarles el tiempo que llevan almacenados. Esto permite ampliar el plazo para concluir el proyecto reproductivo de la pareja, que aumente el número de preembriones disponibles para programas de embriodonación, y prolongar el tiempo de almacenamiento permitido en países con normas muy restrictivas.

049: ESTUDIO DE ANEUPLOIDÍAS ESPERMÁTICAS MEDIANTE HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH) EN PACIENTES PORTADORES DE UNA INVERSIÓN PERICÉNTRICA DEL CROMOSOMA 9

F. Marina, R. Alcolea, M. Rafael, M. Domínguez, L. Jiménez, A. Hernández y S. Marina.
Instituto de Reproducción CEFER. ANACER
e-mail: info@institutocefer.com

INTRODUCCIÓN

Las inversiones pericéntricas del cromosoma 9 son consideradas como una variante normal del cariotipo sin ningún efecto. Algunos autores han sugerido que estas variantes pueden causar alteraciones en el seminograma e infertilidad. En el presente estudio pretendemos determinar si los pacientes portadores de inversión pericéntrica del cromosoma 9 presentan una mayor incidencia de aneuploidías en el semen.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudiamos 13 hombres que acudieron a la consulta con deseo reproductivo y que presentaban en el cariotipo una inversión pericéntrica del cromosoma 9. El seminograma se realizó según la OMS. Para el estudio de FISH se fijaron los espermatozoides con Carnoy y posteriormente se descondensaron las cabezas con DTT (dithiotreitol). Se utilizó como sonda el kit Vysis® Aneuvision compuesto por tres sondas centroméricas (para los cromosomas 18, X e Y) y dos específicas de *loci* (para los cromosomas 13 y 21). En 3 casos

también se estudió el cromosoma 9 (Vysis® TelVysion 9p). Para ambos estudios se utilizó como grupo control semen de donante fértil. En 4 pacientes se realizó estudio meiótico en biopsia testicular.

RESULTADOS

La edad media de los pacientes fue: 36,5 (27-45). El recuento medio por mL fue: 48,5 millones (0,29-200). La media de espermatozoides con morfología normal fue: 22,7% (2-58). El motivo de consulta fue la esterilidad primaria (n=10), secundaria (n=1) e infertilidad (n=2). El FISH para los 5 cromosomas fue normal (n=12). Uno presentaba diploidías significativas (S). No se estudió el 9. El FISH para el cromosoma 9 presentó disomías (S) en 2. Uno fue normal. La meiosis (n=4) fue alterada en 3: anomalías de apareamiento (n=2) y bloqueo (n=1). Normal en un caso.

CONCLUSIÓN

Es difícil encontrar en la bibliografía series grandes de pacientes con anomalías cromosómicas en el cariotipo.

En este estudio, aunque con pocos casos, hemos conseguido una de las series más grandes publicadas en la bibliografía. No podemos sacar grandes conclusiones debido a la heterogeneidad de los resultados. El 61,5% de los pacientes presentaron un recuento espermático normal. Sólo un paciente presentó alteraciones en el FISH (diploidías) cuando estudiamos los cromosomas 13, 18, 21, X e Y. Con los resultados obtenidos, no podemos establecer ninguna relación entre las inversiones pericéntricas del cromosoma 9 y las aneuploidías espermáticas estudiadas. Aunque sólo se han realizado 4 estudios meióticos, el 75% de ellos mostraron alteraciones. Este resultado apunta a un posible efecto de la inversión en la meiosis. Es necesario ampliar los estudios meióticos y de aneuploidías espermáticas del cromosoma 9 para aclarar si las inversiones pericéntricas del cromosoma 9 tienen algún efecto en la espermatogénesis y/o en la meiosis.

050: RELACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULO ENDOTELIAL (VEGF) Y LA INCIDENCIA DE PREECLAMPSIA EN EL EMBARAZO

S. Rafael, S. Veganzones, M. Vidaurreta, V. de la Orden, M.A. Duarez, J.A. Vidart, M. Abad, N. Martell, M. Maestro.
Hospital Clínico San Carlos, Madrid
e-mail: sara.rafael.f@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La preeclampsia es una enfermedad multisistémica, que afecta al 6-8% de los embarazos y permanece como la primera causa de morbilidad materna perinatal en los países desarrollados. Se define por la aparición de hipertensión y proteinuria.

El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) está implicado en la vasculogénesis y la permeabilidad vascular. Se han descrito varios polimorfismos frecuentes en la población, que se asocian con una disminución en los niveles de la proteína. Algunos de estos polimorfismos se han asociado con el riesgo de preeclampsia y la severidad de los síntomas.

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue analizar la asociación entre tres polimorfismos del gen *VEGF* (-2578C/A, -1154G/A y +936C/T) y determinar la influencia en el desarrollo de preeclampsia.

MATERIAL Y METODOS

Se reclutaron 39 gestantes con diagnóstico de preeclampsia, atendidas

en la consulta de Alto Riesgo Obstétrico y en la Unidad de Hipertensión del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Como grupo control de este estudio se reclutaron 35 mujeres con al menos dos embarazos a término y sin hipertensión ni durante el embarazo ni en el puerperio.

El análisis de los polimorfismos -2578C/A, -1154G/A y +936C/T del gen *VEGF* fue realizado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real en Smart Cycler® en el laboratorio de Genómica (Servicio de Análisis Clínicos) del hospital Clínico San Carlos de Madrid.

RESULTADOS

En el polimorfismo -2578C/A, el porcentaje de pacientes con el alelo menos frecuente (genotipos -2578CA y -2578AA) fue menor en las preeclámpticas (51%), respecto a los controles (62%) (OR: 0,80 IC: 0,52-1,23) ($p=0,316$); por el contrario en el polimorfismo +936 C/T se encontró un mayor porcentaje de pacientes con el alelo T en las preeclámpticas (30,8%) respecto a las gestantes sanas (25%) (OR: 0.78 IC: 0,28-2,15) ($p=0.63$);

y en el polimorfismo -1154 G/A se encontraron porcentajes muy similares en ambos grupos (preeclámpticas: 38,5% y controles: 40%) (OR: 1,06; IC: 0.42-2,71) ($p=0,89$).

CONCLUSIONES

A pesar de que no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los polimorfismos, se ha observado una mayor frecuencia del alelo A del polimorfismo -2578C/A en el grupo control, sin embargo el alelo infrecuente del polimorfismo +936C/T está en mayor proporción en el grupo de pacientes con preeclampsia. La mayor frecuencia del alelo T del polimorfismo +936C/T ha sido previamente descrita. Los resultados no fueron estadísticamente significativos probablemente debido al tamaño muestral.

Este trabajo presenta los resultados preliminares del estudio. Es necesario completar el muestreo y análisis en una población de mayor tamaño para poder determinar el efecto de la presencia de los polimorfismos del gen *VEGF* en el riesgo de sufrir preeclampsia.

051: "CAZANDO" GRANDES DELECCIONES CON SNP'S. APLICACIÓN AL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL

C. Giménez, C. Arjona, E. García-Guixé, A. Jiménez-Macedo, M. Sandalinas
Reprogenetics, Barcelona
e-mail: litus@reprogenetics.es

INTRODUCCIÓN

El DGP molecular para el análisis de embriones provenientes de parejas portadoras de patologías genéticas es una técnica ampliamente establecida. Al margen de posibles temas legales, algunas alteraciones génicas pueden

poner en jaque el desarrollo de un protocolo de DGP para enfermedades monogénicas, bien por su tamaño, bien porque las técnicas habituales de detección requieren de grandes cantidades de DNA para su diagnóstico. En ambos casos el análisis de tales anomalías a partir de una sola célula

es muy complicado y variable, por lo que no es recomendable utilizarlo en DGP. En esta situación lo recomendable es realizar un estudio de ligamiento siempre que exista estructura familiar y que esté dispuesta a colaborar, pero, ¿qué hacer cuando la anomalía es *de novo*?

OBJETIVOS

Desarrollar un protocolo de DGP para la detección de grandes deleciones génicas *de novo* que cursan, en un caso, con Neurofibromatosis tipo 1 (NF1) y en un segundo caso con esclerosis tuberosa (TS) tipo 2.

MATERIAL Y MÉTODOS

Persona portadora de una deleción en heterozigosis de los exones 19b a 23.1 del gen NF1.

Persona portadora de una deleción en heterozigosis de los exones 1 al 15 del gen TSC2.

Ambos casos son *de novo*, por lo que no es posible el diagnóstico mediante estudio de ligamiento.

Se localizan microsatélites *up* y *downstream* de los genes implicados así como SNP's dentro de las regiones delecionadas.

RESULTADOS

En el caso de la NF1 se diseñaron y analizaron 7 marcadores polimórficos (STR's) flanqueantes a la región de estudio y se seleccionaron 20 SNP's dentro de la región delecionada. Cinco de los 7 STR's resultaron semi-informativos, mientras que no se encontró informatividad en ninguno de los 20 SNP's seleccionados. Tras informar a la pareja de la situación, ésta decidió desistir de la continuación del estudio.

En el caso de la TS se diseñaron y analizaron 5 marcadores polimórficos flanqueantes a la región de estudio y se seleccionaron 26 SNP's dentro de la

región delecionada. Tres de los 5 STR's y cinco de los 26 SNP's seleccionados resultaron semi-informativos.

La eficiencia de amplificación general es del 95% con una tasa de ADO alrededor del 6%.

CONCLUSIONES

La estrategia descrita nos ha permitido ofrecer el DGP a la pareja en estudio, si bien para poder ejecutarlo ha sido preciso el diseño y análisis de numerosas parejas de *primers* con el subsiguiente coste en tiempo, en esfuerzo y económico.

El DGP para enfermedades monogénicas requiere de una elevada especialización y experiencia que permite poner a disposición de los pacientes protocolos diagnósticos con las más elevadas tasas de fiabilidad.

052: ANEUPLOIDÍAS Y FRAGMENTACIÓN EN EL DNA ESPERMÁTICO ¿EXISTE CORRELACIÓN?

E. Martínez, M^a. Gaytan, A. Liñán, D. Cernuda, M. Ariza, M^aC, Nogales, F. Bronet.
IVI-MADRID
e-mail: EvaMaria.Martinez@ivi.es

INTRODUCCIÓN

Aunque el seminograma constituye un pilar esencial para la evaluación de la esterilidad, en muchas ocasiones no permite detectar la presencia de alteraciones sutiles en el espermatozoide ya que muchos de ellos presentan parámetros normales en el eyaculado. Así pues, un estudio exhaustivo requiere la determinación de otros parámetros encaminados a la profundización del estudio masculino a nivel de la integridad estructural del ADN espermático y a nivel cromosómico (FISH).

El objetivo de este trabajo es estudiar si existe relación entre la fragmentación de ADN y FISH de espermatozoides en alícuotas de muestras seminales empleadas en los tratamientos de microinyección intracitoplasmática de IVI- Madrid

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo de 38 ciclos de pacientes con AR y FI de origen idiopático, dentro del programa de DGP, desde Abril de 2010 hasta Enero de

2011. Todos los varones tenían menos de 45 años (media edad de 39) y tenían un seminograma previo con un resultado normal o levemente alterado (≥ 15 millones/ml, $> 35\%$ de espermatozoides móviles A+B). Se determinó el índice de fragmentación de ADN (DFI), mediante la técnica de TUNEL, tanto en fresco como en capacitado de la muestra seminal el día de la microinyección y además se fijó una alícuota en fresco de cada uno de los eyaculados para realizar la técnica de FISH. El estudio de FISH en el capacitado sólo se realizó en aquellos casos en los cuales el resultado del FISH en fresco fue anormal. Para su análisis se empleó sondas *locus* específicas (LSI) para los cromosomas 13 y 21 y sondas centroméricas (CEP) para los cromosomas 18, X e Y. La media de espermatozoides contados fue de 3350 para los cromosomas X, Y y 18 y 3010 para los cromosomas 13 y 21.

Se llevó a cabo un estudio de dispersión para ver si había correlación entre las dos variables de estudio. Para el análisis estadístico se empleo coeficiente de correlación de Pearson.

RESULTADOS

De los 38 casos, 3 mostraron diferencias significativas con respecto al valor control para las disomías de los cromosomas sexuales (0,37%) tanto en fresco como en capacitado. No se encontraron alteraciones para el resto de cromosomas analizados. Treinta y tres muestras (86,4%) presentaron un DFI inferior al 20%, considerándose por tanto muestras normales. El 13,6 % de las muestras (5 muestras) tuvieron niveles elevados de fragmentación.

El estudio de dispersión muestra que no hay correlación entre DFI y anomalías cromosómicas en espermatozoides para ninguno de los cromosomas estudiados.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio no muestran ninguna correlación entre la fragmentación del DNA espermático y el estudio de aneuploidías.

053: LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

¹A. Mata, ¹A. Garcia, ¹R. Gustà, ¹O. Lopez, ¹O. Martinez-Passarell, ²M. J. Saiz, ¹L. Bassas

¹ Laboratorio de Seminología y Embriología Fundacio Puigvert ² Servicio de Ginecología Hospital de la Santa Creu y Sant Pau Barcelona
e-mail: amata@fundacio-puigvert.es

INTRODUCCIÓN

El estudio de los parámetros seminales, concentración espermática, motilidad, vitalidad y morfología son insuficientes para predecir la capacidad de fecundación en un programa de FIV⁽¹⁾. La integridad del ADN espermático es necesaria para una correcta transmisión del material genético. El genoma paterno es de gran importancia en la iniciación y mantenimiento de la gestación tanto natural como en TRA ⁽²⁾. El análisis del Índice de Fragmentación Espermático (IFE) podría ser útil junto con los parámetros seminales para predecir tanto la gestación espontánea como la FIV

OBJETIVOS

El objetivo de este estudio fue analizar los parámetros seminales convencionales y clínicos junto con el IFE y su correlación con la tasa de fecundación (TF), de gestación (TG) y de abortos (TA) en nuestro programa de FIV.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron un total de 73 muestras de semen procedentes de parejas que acudieron a nuestro centro para técnicas de FIV /ICSI. Se realizó un seminograma a cada paciente el mismo día de la punción folicular según criterios OMS 2010. Se analizó la concentración, motilidad progresiva (a+b), prueba de vitalidad y formas normales. Se realizó el estudio de

la fragmentación espermática con muestras previamente congeladas el mismo día de la punción folicular, con medio crioprotector (Freezing Medium) IrvineScientific®. La prueba de fragmentación del ADN se realizó mediante el método SCD (*Sperm Chromatin Dispersion*) Halosperm®. El resultado se expresó en porcentaje, como índice de fragmentación espermático (IFE) de los espermatozoides fragmentados (halo pequeño, sin halo y degradados) con respecto a los no fragmentados o normales (halo grande y mediano). Para el análisis estadístico se utilizó el t-test para comparación entre grupos que siguieron una normal y el coeficiente de correlación de Pearson mediante el programa informático SPSS vs 12.0 siendo el nivel de significación estadística $p < 0.05$

RESULTADOS

De las 73 parejas estudiadas hubo una tasa de fecundación media \pm SD del (66.91 \pm 24.5%) y una tasa de gestación/ciclo del 39.7 %. El (IFE) de las 73 muestras estudiadas se correlacionó débilmente con la motilidad progresiva ($R = -0.255$ $p = 0.029$) y con las formas normales ($R = -0.212$ $p = 0.075$). Cuando la (TF) fue $< 65\%$ mejoró la correlación entre (IFE) y la motilidad progresiva ($R = -0.401$ $p = 0.031$) junto con las formas normales ($R = -0.50$ $p = 0.006$). Si comparamos gestación versus no gestación, observamos diferencias en la edad de la mujer (media \pm DS) (35.5 \pm 3.8 vs 37.6 \pm 3.2) ($p = 0.020$) y en la edad del hombre (37.7 \pm 4.5 vs 40.1 \pm 4.2)

($p = 0.037$) y en el nº de oocitos MII (9.9 \pm 6 vs 7 \pm 4.2) ($p = 0.033$). No hubo diferencias ni en la (TF) (66.9 \pm 18.9 vs 71.8 \pm 22.3 %) ni en el (IFE) (18.8 \pm 7.9 vs 18.8 \pm 9.8%) ni en los demás parámetros seminales. Se produjeron 8 abortos (27.6%) y únicamente la concentración espermática mostró diferencia significativa entre las gestaciones que finalizaron en aborto y las gestaciones a término (27.7 \pm 20.5 vs 50.9 \pm 50.9) ($p = 0.06$).

CONCLUSIONES

Cuando la tasa de fertilidad es baja, existe una buena correlación inversa entre el (IFE) y los parámetros seminales de motilidad y morfología.

No hemos observado ninguna correlación entre (IFE), tasa de fecundación y gestación.

Creemos que el (IFE) no parece predictivo de fertilidad en un programa de FIV.

Es posible que estudiando subgrupos de pacientes infértiles, éstos podrían beneficiarse de la prueba de integridad de ADN.

Mehdi M et al. Andrologia 2009,41:386-6. Análisis de la fragmentación del ADN en espermatozoides humanos: Correlación con los parámetros seminales.

Sakkas D, Alvarez JG. Fertil. Steril.; (Epub ahead of print) Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis.

054: ESTUDIO DEL TEST HBA REALIZADO EN SEMEN FRESCO Y SEMEN CAPACITADO DE VARONES EN CICLO DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

I. Orozco, A. Gabriel, P. López, A. Guijarro, C. Muñoz, R. Núñez, P. Caballero
Clínica Tambre, Madrid
e-mail: iorozco@clinicatambre.com

INTRODUCCIÓN

El *Sperm-Hyaluronan Binding Assay* (HBA) es una prueba que valora la maduración espermática en semen fresco. Dicha prueba, se basa en la capacidad de los espermatozoides maduros para unirse al ácido hialurónico (AH). Esta molécula es el principal mucopolisacárido de la matriz del *cumulus oophorus* y componente del líquido folicular. Dicha unión con el espermatozoide se correlaciona con un correcto proceso espermiogénico en la remodelación en la membrana plasmática, extrusión de la gota citoplasmática y reemplazo de histonas por protaminas.

OBJETIVO

Identificar y cuantificar los cambios en la capacidad espermática de unión al AH tras el lavado seminal con gradientes de densidad.

MATERIALES Y MÉTODO

Analizamos el semen de 41 pacientes que acudieron para tratamiento de IAC por EOD o factor masculino leve, siendo la edad de la mujer inferior a 38 años.

Como variables dependientes registramos los valores de HBA, vitalidad (mediante el test de naranja de

acridina/bromuro de etidio) y movilidad total antes y después de la capacitación. Para obtener el valor de HBA, se analizó el porcentaje de espermatozoides unidos a AH (sin desplazamiento pero con movimiento flagelar), respecto al número total de espermatozoides móviles + espermatozoides inmóviles con batida flagelar. Aquellos espermatozoides absolutamente inmóviles, no fueron valorados.

Como variables independientes recogimos el volumen del eyaculado y la concentración espermática antes y después del capacitado. Además, analizamos la adecuación a la normalidad mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, las diferencias de medias pre y postcapacitado con la T de Student para muestras pareadas y las correlaciones entre variables con el test de Pearson. El modelo predictor multivariado fue realizado mediante análisis de covarianzas para muestras repetidas (ANCOVA-MR) y regresión lineal multivariante. El límite de significación se estableció en todos los casos en 0,05.

RESULTADOS

Las diferencias en el porcentaje de HBA, vitalidad y movilidad fueron de 7,37, 9,24 y 29,80 respectivamente (DE:

14,20, 6,80 y 9,08. CV: 192,67, 73,59 y 30,47).

De las tres variables dependientes (HBA, vitalidad y movilidad), sólo el porcentaje de HBA mostró una correlación significativa entre los valores en fresco y tras la capacitación. Los cambios en movilidad y vitalidad con la capacitación muestran una correlación lineal entre sí, pero el cambio en HBA no se relaciona de forma lineal con ninguno de ellos.

Encontramos un modelo multivariante capaz de predecir los cambios en HBA con el capacitado a partir del total de espermatozoides en fresco (volumen x recuento), el HBA inicial y el cuadrado de la movilidad en fresco.

CONCLUSIONES

Tras la capacitación con gradientes la media de HBA de la muestra sufrió un incremento de 7,37%, siendo muy alta la variabilidad de este cambio, con muchos casos en los que el HBA disminuyó tras el capacitado.

Parámetros habituales como el volumen, recuento espermático, movilidad y HBA en fresco permiten predecir un 68,1% de la variación total en HBA que tendrá la muestra tras la capacitación.

055: LAH (LASER ASSISTED HATCHING) EN CICLOS DE FIV/ICSI EN 2 GRUPOS DE EDADES

B. Amorocho, G. Calderón, D. Gumbao, L. Fernández, J. Landeras.
IVI Murcia
beatriz.amorocho@ivi.es

INTRODUCCIÓN

Durante la década pasada han sido ofrecidos diferentes métodos para la

manipulación de la zona pelúcida en mujeres de edad avanzada. Sin embargo existe una incertidumbre considerable acerca de la efectividad de la técnica en

embriones que provienen de mujeres en edad reproductiva avanzada. La revisión realizada por Das S et al., en 2010 sobre 28 estudios, revelan que hay

evidencias donde el *Assisted Hatching* puede incrementar las tasas de éxito en mujeres con fallo de implantación y probablemente en edad avanzada, pero se debe de estudiar más las tasas de embarazo múltiple.

OBJETIVOS

El objetivo de este estudio es valorar el efecto del LAH en función de los resultados en tasa de gestación, implantación y aborto en 2 grupos de edades en ciclos de FIV/ICSI.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio prospectivo y randomizado, realizado en el IVI-Murcia, entre el 1 de Marzo de 2006 y el 31 de Dic de 2010. Se estudiaron 209 ciclos FIV/ICSI realizados en mujeres ≥ 38 años, que de forma aleatoria fueron distribuidos

en 2 grupos: A 104 ciclos se les realizó LAH (Grupo LAH) y a los 105 ciclos restantes no se les realizó LAH (Grupo No LAH). Dentro de estos dos grupos se subdividieron en edades:

LAH 38 y 39 años, No LAH 38 y 39 años, LAH ≥ 40 años y No LAH ≥ 40 años.

A cada uno de los embriones a transferir en D3 de desarrollo se le realizó un afinamiento de la zona pelúcida usando el sistema *Octax laser shot* cuando les correspondía el *Assisted Hatching*.

Los grupos fueron homogéneos en cuanto a IMC, edad, calidad embrionaria y número de embriones transferidos/ciclo.

El análisis estadístico se realizó con el test de Fisher con valor significativo cuando $p < 0,05$.

CONCLUSIONES

Según estos resultados, no encontramos diferencias estadísticamente significativas aunque sí hay una tendencia en favor del LAH en tasas de gestación/ implantación en grupo global de LAH/No LAH $p=0,46/p=0,31$. En los resultados según edad, encontramos diferencias significativas en tasas de gestación/ implantación en los grupos de 38 y 39 años con LAH y sin LAH.

Este estudio revela la efectividad de la técnica LAH en mujeres pertenecientes a grupos de edades entre 38 y 40 años con buenos resultados en tasas de gestación e implantación.

A partir de 40 años, no encontramos efecto beneficioso de LAH aislado (sin DGP) y puede ser debido a la presencia de anomalías cromosómicas en los embriones de este grupo de pacientes.

	Tasa de Gestación	Tasa Implantación	Tasa Aborto
LAH ≥ 38 años	38%	24,4%	22%
No LAH ≥ 38 años	29,2 %	19,6%	22%

Resultados globales de LAH y No LAH en mujeres ≥ 38 años

	Tasa de Gestación	Tasa Implantación	Tasa Aborto
LAH 38 y 39 años	45,0% a	35,0 % b	21,0%
No LAH 38 y 39 años	27,6% a	20,0 % b	19,0%
LAH ≥ 40 años	19,0%	12,5%	37,5%
NO LAH ≥ 40 años	34,5%	22,2%	30,0%

a $p=0,0486$ b $p=0,0173$

Resultados por grupos de pacientes según edad y LAH / No LAH

056: SELECCIÓN ESPERMÁTICA MEDIANTE EL USO DE LOS MEDIOS POLIVINILPIRROLIDONA (PVP) Y HIALURONATO (SPERMSLOW). INFLUENCIA EN LA CALIDAD EMBRIONARIA

M. T. Cañete, S. García, L. Font, A. Sánchez-Oliver, E. Flores, R. García-Otero, C. Martínez.
EMBRYOCENTER CIVTE Sevilla
e-mail: mtcanete@civte.com

INTRODUCCIÓN

El ácido hialurónico se encuentra de forma natural en el ovocito, ya que está presente en la matriz extracelular

que lo rodea. Los expertos señalan que los espermatozoides maduros que han externalizado sus receptores son capaces de unirse al ácido hialurónico.

OBJETIVO

Por tanto nuestro objetivo sería comparar el uso del ácido hialurónico en relación al PVP (Polivinilpirrolidona) en

cuanto a tasa de fecundación y calidad embrionaria en día +3.

MATERIAL Y METODOS

Se realizó un estudio prospectivo comparativo entre los medios de hialuronato (SpermSlow, Medicult) y polivinilpirrolidona (PVP, SageMedia) en la selección espermática de pacientes sometidas a ICSI.

RESULTADOS

Se microinyectaron 400 ovocitos: 200 con espermatozoides seleccionados en SpermSlow y 200 seleccionados en PVP. No encontramos diferencias significativas en las tasas de fecundación. Sin embargo, según los criterios de calidad embrionaria de ASEBIR, observamos diferencias estadísticamente significativas en los embriones de calidad A en día +3 en los seleccionados con SpermSlow.

CONCLUSIONES

La unión de los espermatozoides al ácido hialurónico muestra una mejora en cuanto a la calidad de los embriones en día +3, por lo que su uso está recomendado al no ser una sustancia que podría tener efecto dañino en los mismos y por ser componente de la matriz extracelular del ovocito.

057: RESULTADOS PROGRAMA DE DONACIÓN DE EMBRIONES EN IVI MADRID

S. Pareja; L. Herrero; MJ. Molina; M. Jiménez; J. Fernández; Y. Mínguez
IVI Madrid
e-mail: sandra.pareja@ivi.es

INTRODUCCIÓN

La criopreservación embrionaria es una técnica que se emplea de rutina en los centros de Reproducción Asistida y que permite a los pacientes conservar sus embriones sobrantes para futuros intentos de embarazo. Existen parejas que por motivos muy diversos no llegan a utilizar nunca sus embriones congelados. La donación de esos embriones congelados a otras parejas es una alternativa aceptada en muchos países y que nuestra legislación también contempla (45/2003 y 14/2006), permitiendo así establecer un programa anónimo de donación de embriones en beneficio de pacientes estériles. El objetivo de este estudio retrospectivo es relatar nuestra experiencia y los resultados de nuestro programa de donación de embriones durante un período de 5 años, desde el año 2005 hasta el año 2010.

MATERIAL Y MÉTODOS

En nuestro centro las pacientes firman anualmente, y transcurridos dos años desde la criopreservación de los embriones, un consentimiento sobre el posible destino de sus embriones congelados: 1-continuar almacenados en el banco, 2-donación a investigación o 3-donación a otras parejas infértiles. Las parejas son citadas en la clínica para valoración de su situación concreta y posible asesoramiento relacionado

con los consentimientos a firmar. En los casos de donación de embriones a otros pacientes, las parejas gozan de tiempo suficiente que asegure una correcta decisión, y además mantienen una entrevista con una enfermera especializada, y en caso necesario con su ginecólogo y/o psicólogo del centro. Los antecedentes genéticos se valoran mediante test de enfermedades hereditarias en la familia.

En los donantes de embriones se analiza el VIH, hepatitis B y C y no reciben compensación económica por la donación. Se tiene en cuenta, salvo que los pacientes no lo consideren imprescindible, la compatibilidad sanguínea y fenotípica. A los receptores se les informa del grupo sanguíneo y de la edad de los donantes. Los embriones proceden de pacientes que en el momento de su tratamiento eran menores de 35 años.

Entre 2005 y 2007, un total de 2223 parejas fueron informadas sobre el posible destino de sus embriones. Cuarenta y seis de estas parejas estuvieron de acuerdo en donar sus embriones a otras pacientes estériles. Los embriones donados habían sido congelados y descongelados por el método de congelación lenta y el endometrio se preparó mediante protocolo estándar de TRA. Entre 2005 y 2009, se comenzaron 103 ciclos y finalmente un total de 84 receptoras

fueron transferidas con embriones descongelados donados.

RESULTADOS

De un total de 103 ciclos comenzados de donación de embriones se realizaron 84 transferencias (81,4%). Se observó resultado positivo de β -hCG en 43 de estas 84 transferencias (51,2%) y la tasa de embarazo clínico por embrión transferido fue de 44%. La tasa de implantación fue de 26% y el 8% terminó en aborto.

CONCLUSIONES

La donación de embriones representa una herramienta muy útil para ayudar a algunas parejas estériles. Nuestros resultados son inferiores a los obtenidos con nuestro programa de donación de ovocitos (61% de tasa de gestación y 40% de implantación). Sin embargo, para la paciente el coste de este tipo de tratamiento es considerablemente inferior al del ciclo de donación de ovocitos. Esa diferencia y la inmediatez en el tratamiento se refleja en una mayor demanda en la donación de embriones en los últimos tiempos.

El aumento de estos tratamientos nos permitirá en breve realizar un análisis más detallado del programa y confiamos que con la vitrificación de embriones, implantada en los últimos años en nuestro laboratorio, aumentará indudablemente la eficacia del programa.

058: LA FRAGMENTACIÓN DE ADN EN SEMEN PUEDE DISMINUIRSE REDUCIENDO LOS DÍAS DE ABSTINENCIA A UNO

I. Pons, R. Cercas, C. Villas, C. Braña, S. Fernández-Shaw
URH García del Real, Madrid
e-mail: ipons@urh.es

INTRODUCCIÓN

Diferentes estudios sugieren que disminuyendo el tiempo de abstinencia, se puede mejorar la fragmentación de ADN de los espermatozoides.

Esta fragmentación se puede medir, entre otras técnicas, mediante el SCD (*Sperm Chromatin Dispersion test*) y se considera que una fragmentación igual o superior al 30% puede ser perjudicial para conseguir un embarazo a término.

OBJETIVO

En este estudio prospectivo tratamos de comprobar que se puede disminuir la fragmentación de ADN en semen reduciendo los días de abstinencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Desde Mayo de 2008 en nuestra Unidad se determina la fragmentación de ADN en espermatozoides mediante el test SCD tras 3 a 7 días de abstinencia a todos los pacientes que cumplan una o más de estas características: BMI > 25, más de 45 años, consumo de tabaco >10 cigarrillos/día, consumo de alcohol > 6 unidades/semana, dos o más abortos, fallo de implantación,

varicocoele, criptorquidia, oligoteratoastenozoospermia severa, diabetes mellitus o quimioterapia.

Desde enero 2009 a los pacientes con una fragmentación $\geq 30\%$ se les recomienda obtener otra muestra tras un día de abstinencia.

Las muestras que mejoran su fragmentación ($\leq 30\%$), se congelan y mantienen congeladas hasta que se utilizan para el ciclo de FIV/ICSI.

Si no se consigue disminuir la fragmentación por debajo del umbral de normalidad después de tres intentos tras un día de abstinencia se le recomienda al varón realizar una biopsia testicular que se congelará y mantendrá congelada para su posterior utilización en su ciclo de FIV/ICSI si no supera el límite del 30%.

RESULTADOS

De las 314 fragmentaciones diagnósticas realizadas, 44 (14%) resultaron alteradas ($\geq 30\%$).

De éstas, 36 pacientes repitieron la fragmentación con una muestra obtenida tras un día de abstinencia

y en el 77.8%(28/36) de los casos se consiguió disminuir la fragmentación por debajo del 30%. En el primer intento lo consiguieron el 67.9%(19/28), en el segundo el 25%(7/28) y en el tercer intento el 7.1%(2/28).

Se realizaron tres biopsias testiculares en pacientes a los que no se les consiguió disminuir la fragmentación en tres intentos tras un día de abstinencia. En dos de ellos (66.6%), la fragmentación resulto menor al 30%.

CONCLUSIONES

La mayoría de los pacientes con la fragmentación de ADN alterada pueden conseguir disminuirla por debajo del umbral del 30% reduciendo los días de abstinencia a uno.

Las muestras con fragmentación normal pueden congelarse para usarse en un ciclo de FIV/ICSI.

Si no se consigue disminuir la fragmentación por debajo del umbral de normalidad del 30%, se puede ofrecer la realización de una biopsia testicular.

059: CALIDAD EMBRIONARIA DE OOCITOS DONADOS DESVITRIFICADOS VS FRESCOS

E. Huguet, D. Agudo, M. Alonso, C. López, F. Bronet
IVI-Madrid Aravaca
e-mail: eva.huguet@ivi.es

INTRODUCCIÓN

Desde la introducción de la técnica de vitrificación en los Laboratorios de FIV como una técnica rutinaria se han realizado muchos estudios que han demostrado la preservación del potencial de fecundación y desarrollo

embrionario similares en el caso de oocitos desvitrificados y frescos. Para no introducir el factor de calidad oocitaria, el estudio se ha realizado con embriones del programa de donación de óvulos, no haciendo distinción en el diagnóstico masculino.

OBJETIVO

El principal objetivo es mostrar de manera fehaciente y estadística cómo es la calidad de aquellos embriones procedentes de oocitos vitrificados (EPOV) y de los procedentes de oocitos frescos (EPOF), atendiendo a los

parámetros de morfología y cinética embrionaria utilizados en nuestro laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Es un estudio retrospectivo que abarca en 43 meses 467 ciclos con 2940 embriones provenientes de 5963 MetII en el grupo EPOV y 2215 ciclos con 13960 embriones provenientes de 20195 MetII del grupo EPOF; todos ellos con transferencia. En la donación de óvulos se realiza siempre ICSI.

Los parámetros que se han medido son: nº de células, % de fragmentación, presencia de blastómeras multinucleadas (BMN), simetría, compactación (D3) y calidad global del embrión, valorada esta última como Excelente (4 células para D2, 8 cél. para D3, sin fragmentos, simetría perfecta, sin BMN), Buena (4 cél. para D2, 8 cél. para D3, $\leq 10\%$ de fragmentos, simetría casi perfecta, sin BMN), Regular (4 cél. para D2, 7-8 cél. para D3, $< 21\%$ de fragmentos, simetría con más 20% diferencia, sin BMN), Mala (4 cél. para D2, 7-8 cél. para D3, $> 20\%$ de fragmentos, mala simetría, con o sin BMN).

También se han analizado los resultados globales: Tasa de Gestación Clínica (TGC), Tasa de Aborto Clínico, Tasa de Implantación (TI), Tasa de RNV, y en particular los embriones que han generado un RNV.

Se ha utilizado el programa G-STAT 2.0 para el análisis estadístico de los datos.

RESULTADOS

D2: ambos grupos comparables en cuanto al nº de cél. y fragmentación. Los EPOF tienen más BMN (9.1% vs 3.2%; $p < 0.0001$) y mejor simetría (42% vs 39.4%; $p = 0.0134$).

D3: más embriones rápidos (> 10 cél.) en EPOF (9.1% vs 6.3%; $p < 0.0001$) y más lentos (< 7 cél.) en EPOV (35.9% vs 30.7%; $p < 0.0001$). En D5 hay más blastocistos en EPOF. En cuanto a la fragmentación los EPOV tienen el doble de tasa de fragmentación dentro del rango 21-40% (4.9% vs 2.9%; $p < 0.0001$). La compactación es mayor en los EPOV (38.5% vs 34.2%; $p < 0.0001$) y la simetría es comparable en ambos. En cuanto a BMN la tasa es mayor en EPOV (13.3% vs 3.9%; $p < 0.0001$).

Calidad global embrionaria: hay más embriones de calidad buena y regular en los EPOF tanto en D2 (54.3% y 65.8% vs 18.8% y 13.9% respectivamente; $p < 0.0001$) como en D3 (22.9% y 35.9% vs 9.6% y 11.1% respectivamente; $p < 0.0001$).

Los EPOV tienen mejores tasas de RNV/ET (30.3% vs 25.1%; $p < 0.005$) en cualquier día de transferencia (2, 3, 5, 6) y mayor T.I. cuando la transferencia es en D5/6 (52.5% vs 31.6%; $p < 0.05$). Sin embargo, los embriones transferidos que generan RNVs son más compactados en los EPOV (72% vs 64%; $p = 0.0054$) y con menor tasa de BMN en los EPOF (98% vs 94%; $p < 0.0001$).

CONCLUSIONES

Aunque hay diferencias observando aisladamente los parámetros morfológicos, se puede concluir que los EPOV son más lentos en su desarrollo y producen menos embriones de calidad Buena/Regular que los EPOF.

060: INFLUENCIA DE LA TERAPIA HORMONAL EN PACIENTES CON OLIGOZOOSPERMIA IDIOPÁTICA MODERADA

D. Pabón, M. Martínez, N. Torres, L. Rodríguez, S. Pérez, I. Fernández, E. Muñoz, J. Remohí.
IVI-VIGO
e-mail: dina.pabon@ivi.es

INTRODUCCIÓN

Las hormonas FSH (hormona folículo estimulante) y HCG (hormona coriónica humana) juegan un papel crucial en la inducción y mantenimiento de la espermatogénesis, debido a este papel fisiológico se han estudiado tratamientos hormonales que pudieran servir como terapia en pacientes con oligozoospermia idiopática. Algunos grupos como (Baccetti *et al* 2004; Foresta *et al* 2005 & 2007) que han usado la FSH, y la HCG como tratamiento, han reportado mejoras en la calidad seminal y/o en las tasas de gestación. Dado estos efectos obtenidos, se ha sugerido el uso de FSH y HCG como tratamiento sustitutivo, sostenido y

prolongado en infertilidad idiopática. En algunos casos se ha logrado activar la espermatogénesis en hombres que padecen infertilidad idiopática. Sin embargo, otros estudios que han usado estas drogas como tratamiento en infertilidad idiopática, no destacan ninguna ventaja (Matorras *et al.*, 1997; Kamischke *et al.*, 1998).

OBJETIVO

Evaluar en pacientes oligozoospermicos con niveles normales o bajos de FSH, el efecto de la terapia con FSH y HCG, en relación a calidad seminal, tasa de gestación y resultados de Recién Nacidos Vivos (RNV).

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio prospectivo aleatorio de 30 pacientes diagnosticados con oligozoospermia idiopática moderada, que con sus parejas se someterían a ICSI. La evaluación del varón incluye: examen urológico, exploración testicular física y ecográfica normal, niveles séricos de FSH < 10 UI/mL, cariotipo normal, ausencia de marcadores de infección seminal, sin leucospermia. 15 pacientes recibieron tratamiento hormonal durante 6 semanas, alternando diariamente 75 UI/d SC de FSH (Gonal F® - Merck-Serono, España) 3 veces a la semana, con 2 dosis de 2500 UI/d de hCG (hCG-Lepori®, Pharma-Lepori, España). Se incluyen 15 pacientes controles que no recibieron

ningún tratamiento. Los criterios para evaluar la respuesta al tratamiento son calidad seminal, tasa de gestación y RNV.

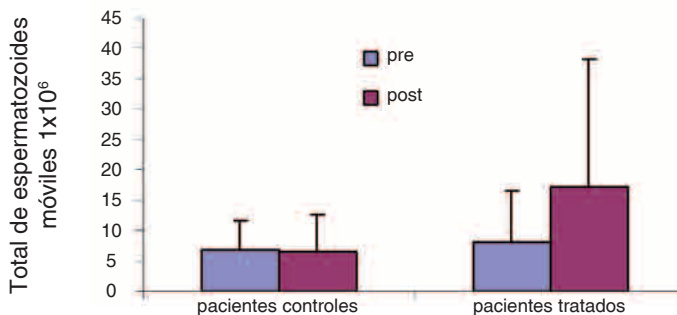
RESULTADOS

En la evaluación de nuestros resultados, el 100% de los pacientes

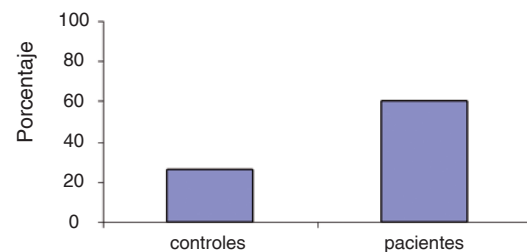
que han recibido tratamiento, incrementaron significativamente la calidad seminal, en relación al total de espermatozoides móviles progresivos. La tasa de gestación para estos pacientes es del 60% mientras que la tasa de gestación para los pacientes no tratados es del 26.6%. La tasa de RNV

para los pacientes tratados también se ve incrementada en comparación con los pacientes no tratados. No se han encontrado diferencias en parto prematuro, ni periodo gestacional medio, ni entre las tallas y pesos de los RNV, entre los grupos.

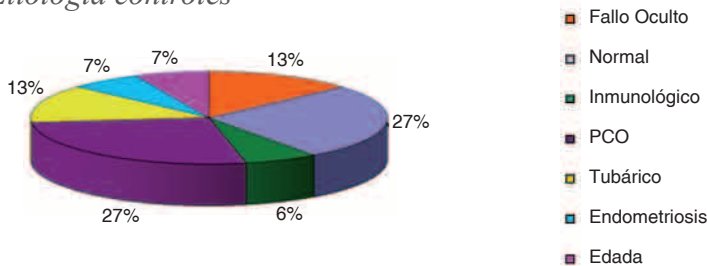
Valoración de calidad espermática



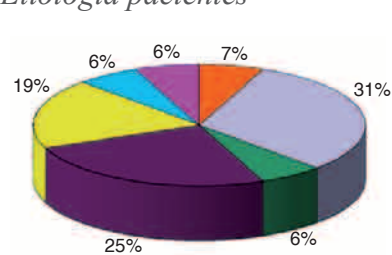
Tasa de gestación



Etiología controles



Etiología pacientes



CONCLUSIONES

Nuestros resultados preliminares indican cómo en pacientes diagnosticados con oligozoospermia idiopática, los

tratamientos suministrados de FSH + HCG, incrementan tanto la calidad seminal como la tasa de gestación y de RNV, en tratamientos de ICSI, pero un estudio con un número mayor de casos

donde se incluyan diferentes criterios de selección de los sujetos sería necesario para corroborar los hallazgos.

061: VALOR DIAGNÓSTICO DEL TEST HBA EN PACIENTES QUE SE SOMETEN A TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

G. López, R. Lafuente, I. Linares, A. Brassesco, M. Brassesco
CIRH
e-mail: glopez@cirh.es

INTRODUCCIÓN

El test HBA (*Hyaluronan Binding Assay*) es un ensayo cualitativo de la madurez de los espermatozoides. Sólo los espermatozoides móviles y maduros son capaces de unirse al ácido hialurónico, el

principal mucopolisacárido de la matriz del *cumulus oophorus* y un componente del líquido folicular humano.

El proceso de fecundación requiere que el espermatozoide reconozca y penetre las capas que rodean al ovocito

(*cumulus oophorus* y zona pelúcida), para ello, el espermatozoide maduro produce como mínimo dos proteínas específicas de unión al hialuronato, de las cuales una está implicada en la penetración del espermatozoide en la matriz del cúmulo. Además de la

madurez espermática, la integridad del material genético del espermatozoide también parece estar relacionada con su capacidad de unión al hialuronato.

OBJETIVOS

Se pretende determinar la eficacia del test HBA como herramienta para pronosticar el potencial de fertilidad masculina en pacientes que se someterán a un tratamiento de reproducción asistida.

MATERIAL Y MÉTODOS

En estudio prospectivo se seleccionan parejas formadas por mujeres sanas menores de 37 años y hombres sanos menores de 45 años con indicación de Fecundación *in vitro*.

Se excluyen pacientes con patologías asociadas que pueden interferir con el tratamiento de estimulación ovárica como: endometriosis, baja respuesta al tratamiento, ovario poliquístico, hombre con varicocele o cuyo seminograma muestra una concentración espermática inferior a 10 M/mL y/o que está tomando medicación que pueda afectar la producción o la calidad espermática.

En el periodo comprendido entre enero y mayo del 2011 se incluyen un total de 25 parejas en el estudio preliminar.

Cada pareja entrega una muestra de semen obtenida mediante masturbación tras mantener de 2 a 5 días de abstinencia. Cada muestra fue evaluada mediante seminograma completo, valorando concentración, movilidad y morfología. Se realizó también el test HBA y el Test de magnificación que permite clasificar a los espermatozoides en cuatro categorías en función del número y tamaño de vacuolas (Grado I: Forma normal sin vacuolas; Grado II: Forma normal y un máximo de 2 vacuolas pequeñas; Grado III: Forma normal y al menos una vacuola grande; Grado IV: Forma anormal y/o otras anomalías). Tras la realización del ciclo de FIV se valora el porcentaje de fecundación, la calidad embrionaria y el resultado del ciclo.

El resultado del test HBA, obtenido como el porcentaje de espermatozoides maduros, se compara con las diferentes variables estudiadas.

RESULTADOS

Al comparar el resultado del test HBA con los parámetros básicos del seminograma, se observa una correlación positiva entre ellos, de tendencia más marcada cuando se trata de la movilidad.

Lo mismo sucede con el grado de vacuolización espermática. Una mayor madurez espermática se correlaciona

con espermatozoides de grados I y II. Dichos espermatozoides presentan un máximo de 2 vacuolas pequeñas y son los más indicados para la microinyección de los ovocitos.

Por último, se observa también una correlación positiva entre el porcentaje de espermatozoides maduros y el porcentaje de fecundación ovocitaria.

CONCLUSIONES

A pesar del reducido número de casos y de tratarse de un estudio preliminar, gracias a la tendencia observada entre las relaciones estudiadas, se observa una relación directa entre la madurez de los espermatozoides y los diferentes parámetros del seminograma.

Si tenemos en cuenta también la relación que se observa entre el grado de vacuolización del núcleo del espermatozoide y el porcentaje de fecundación con la madurez espermática, podemos deducir que el test HBA para evaluar el potencial de fertilidad masculino puede ser una buena herramienta diagnóstica.

Seguimos ampliando este estudio para obtener un grupo de pacientes significativo que permita valorar también, la calidad embrionaria y el resultado de embarazo en los diferentes grupos de pacientes.

062: ESTUDIO DE RECLUTAMIENTO NATURAL VS ESTIMULACIÓN CONVENCIONAL EN INSEMINACIONES INTRAUTERINAS (IIU)

D. Pabón, A. Carballo, M. Martínez, N. Torres, L. Rodríguez, B. Martínez, JM. Gacias, I. Fernández, S. Portela, E. Muñoz, J. Remohí.
IVI-VIGO
e-mail: dina.pabon@ivi.es

INTRODUCCIÓN

En los últimos años surge un concepto de estimulación suave relacionado con ciclos de inicio tardío en la estimulación sobre el 4º-5º día del ciclo, aprovechando el reclutamiento natural (RN). Los estudios de RN realizados, en tratamientos de FIV, han indicado que éstos no solo mejoran la calidad de los ovocitos recuperados, sino también se

asocia una mayor tasa de implantación y de gestación, comparándolos con la estimulación convencional (EC). Por otra parte se reduce el posible daño en la receptividad endometrial producto de la estimulación con menores dosis de medicación, además de presentar una evidente reducción de los costes del ciclo. Los estudios de RN se han llevado a cabo en tratamientos de FIV, pero no se encuentran en la literatura para IIU.

OBJETIVO

Nuestro propósito es evaluar los resultados de IIU realizadas con un protocolo nuevo de RN con respecto a los resultados obtenidos usando EC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio Aleatorio prospectivo en el que se incluyen tratamientos de

IIU realizadas en IVI-VIGO desde 01/01/2009 hasta 01/03/2011. Se incluyen en el estudio pacientes menores de 41 años, con ciclos regulares espontáneos, cavidad uterina normal con evidencia tubárica bilateral, que no hayan tenido más de 3 ciclos previos de IIU y con un ciclo previo para garantizar el reposo ovárico. De las 43 pacientes, 23 recibieron aleatoriamente el protocolo de RN y 20 el protocolo de EC. El protocolo de RN consistió en controlar el desarrollo folicular hasta encontrar un folículo dominante de diámetro medio ≥ 11 mm, momento en el que se inició la estimulación administrando 75 UI/d de hMG/día ultrapurificada (Menopur® FERRING) hasta conseguir 1 o 2 folículos ≥ 17 mm \emptyset , momento en el que se determinan los niveles de estradiol y progesterona y se desencadena la

ovulación. En el protocolo de EC la estimulación se inició el 2do-3er día del ciclo con 75 UI/d de hMG, por 5 días y periódicamente se controla la respuesta ovárica hasta alcanzar 1 o 2 folículos dominantes, momento en el que se desencadena la ovulación y 24h después se programa la IIU.

RESULTADOS

Se incluyen 43 pacientes, 23 de las cuales recibieron el protocolo de RN y 20 el protocolo de EC. Para los dos protocolos, no se encontró diferencias en edad media de las pacientes, ni en los niveles basales de FSH, Estradiol y progesterona, ni en el número de espermatozoides depositados en la inseminación tras la capacitación espermática. El número promedio de folículos de diámetro mayor o igual a

17mm también fue similar para los 2 grupos, ($1,2 \pm 0,5$ vs 1 ± 0) ($p:0,49$) la tasa de gestación para el protocolo de RN fue del 10,3% y para el EC fue del 21,9%.

Hasta el momento no se han encontrado diferencias entre la tasa de aborto, embarazo ectópico, parto prematuro, ni periodo gestacional medio.

CONCLUSIÓN

Nuestros resultados muestran que no hay perjuicios en usar el RN en las IIU. Nuestro equipo ha descrito un nuevo protocolo de estimulación suave usando como base el RN que permite un ahorro económico a los pacientes. Esperamos conseguir un estudio con mayor número de casos para confirmar los beneficios del RN en IIU.

063: INFLUENCIA DE LA DOSIS ADMINISTRADA DE FSH EN LA ESTIMULACIÓN DE DONANTES DE OVOCITOS, COMBINADA CON LA EDAD DE LA DONANTE

D. Agudo.; M. Alonso.; C. López.; E. Huguet.; M. Testillano.; D. Becerra.; M. Patiño.; F. Bronet
IVI MADRID
e-mail: david.agudo@ivi.es

INTRODUCCIÓN

Los criterios de selección de donantes de ovocitos pueden ser muy variados, atendiendo al IMC, entrevista psicológica, serologías, cariotipo, embarazos previos, hábitos tóxicos, características físicas. Una de las características más valoradas es la edad de la donante, por lo que en España, la edad límite para aceptar a una donante de ovocitos es de 35 años. Por otra parte, las dosis de FSH empleadas para la estimulación ovárica, en tratamientos de reproducción asistida, está ligada de manera directamente proporcional a la edad de la paciente o donante a estimular y que se relaciona a su vez con la reserva folicular, por lo que un ovario que necesite altas dosis de FSH, puede indicar una peor respuesta, que suele acompañarse de una peor calidad ovocitaria y embrionaria, lo cual se reflejará en los resultados.

OBJETIVOS

Determinar si las dosis de FSH empleadas en la estimulación ovárica, influyen en los resultados de nuestro programa de donación de ovocitos, dilucidando si la edad de las donantes, combinada con las dosis empleadas, presentan un efecto sinérgico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo de 486 ciclos de donación de ovocitos procedentes de 291 donantes con edades comprendidas entre 18-21 años (grupo 1) y 195 donantes entre 30-34 años (grupo 2). Las donantes se estimularon con dosis de FSH variables en función del número de antrales, ≤ 150 UI con más de 14 folículos antrales (151 donantes del grupo 1, y 65 donantes del grupo 2), y >150 UI con 14 folículos antrales o menos, independientemente de la

edad (140 donantes del grupo 1 y 130 donantes del grupo 2).

Los test, t de student y χ^2 fueron empleados para comparar porcentajes, considerándose estadísticamente significativos valores medios de $p < 0.05$.

RESULTADOS

La media de ovocitos obtenidos en el grupo 1, fue de 19.5 ovocitos, frente a 16.5 del grupo 2.

Al comparar el porcentaje de ciclos de donantes del grupo 1 que necesitan ≤ 150 FSH (51.9%) frente a las del grupo 2 (33.3%), observamos diferencias significativas ($p = 0.01$).

No se observan diferencias significativas al comparar tasas de gestación bioquímica (TGB), tasa de gestación clínica (TGC) y tasas de implantación

(TI) de las donantes del grupo 1 (60.3%, 54.2% y 37.2%), frente a las del grupo 2 (60.9%, 54.7% y 35.7%).

Al comparar los resultados de las donantes del grupo 1 estimuladas con ≤ 150 FSH (TGB: 64.3%, TGC: 56.6% y TI: 39%), frente a las estimuladas con > 150 FSH (TGB: 56.4%, TGC: 51.9% y TI: 35.4%) no se observan diferencias significativas.

Sin embargo cuando comparamos los resultados de las donantes del grupo 2 estimuladas con ≤ 150 FSH (TGB: 74.1%, TGC: 65.5% y TI: 42.3%), frente

a las estimuladas con > 150 FSH (TGB: 55.5, TGC: 49.6% y TI: 33.9%) si se observan diferencias estadísticamente significativas en términos de TGB: $p=0.016$, y TGC: $p=0.045$, y una tendencia hacia la significación en el caso de la TI: $p=0.089$.

CONCLUSIONES

La edad de las donantes se correlaciona directamente con las dosis necesarias de FSH para conseguir un número de ovocitos similares en los grupos de edad estudiados.

No existen diferencias significativas en los resultados atendiendo sólo a la edad de las donantes.

Cuando desglosamos no solo por edad, sino por dosis de FSH administrada, observamos como las donantes mayores de 29 años, se comportan de manera diferente en función de la dosis de medicación, obteniéndose mejores resultados si no se tienen que emplear altas dosis de FSH para su estimulación ovárica.

064: ANÁLISIS COMPARATIVO DEL ÉXITO EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA DE MUESTRAS SEMINALES CON SCD PATOLÓGICO Y NO PATOLÓGICO

I. Moragues, B. Ramos, A. Montoya, N. Wegmann, J. Aizpúrua
IVF Spain (Alicante)
e-mail: i.moragues@ivf-spain.es

INTRODUCCIÓN

Diversos autores han correlacionado los valores de fragmentación del ADN espermático con los resultados de los Tratamientos de Reproducción Asistida (TRA) para establecer un punto de corte a partir del cual se pueda predecir el resultado de las mismas, con resultados aceptablemente congruentes. Se ha demostrado que los varones infértiles tienen una mayor fracción de espermatozoides con roturas en el ADN, y que este hecho puede tener un impacto negativo en los resultados de las técnicas de reproducción asistida. Las muestras de semen que muestran altos niveles de daño en el ADN están con frecuencia asociadas a una disminución de las tasas de

fecundación o implantación después de FIV/ICSI, y pueden estar asociadas a mala calidad embrionaria, bloqueo embrionario o aborto. Aunque en estos procedimientos se seleccionan los espermatozoides de mejor motilidad y morfología, debido a la limitación de la técnica usada, siempre hay un porcentaje de los mismos que contienen varios grados de daño en el ADN y que pueden alcanzar el ovocito con un mínimo o ningún esfuerzo (FIV o ICSI).

OBJETIVOS

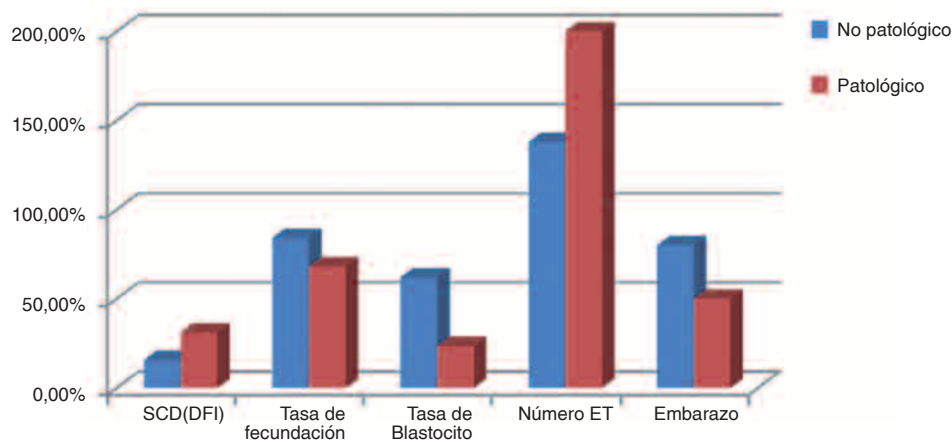
El objetivo del estudio es concluir si dicho parámetro de fragmentación se puede utilizar de forma rutinaria como un valor predictivo de éxito en las TRA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Realizamos un análisis prospectivo de 200 ciclos de ovodonación con el fin de comparar los resultados en TRA de dos grupos de varones. Varones con DFI patológico $\geq 30\%$ y un segundo grupo con DFI no patológico $\leq 30\%$. Realizamos la medida del DFI (*DNA fragmentation index*) en semen en fresco. Utilizamos el Kit comercial de Halosperm® y correlacionamos los índices de fragmentación con los parámetros seminales y con los resultados obtenidos tras llevar a cabo la TRA: tasa de fecundación, calidad y desarrollo embrionario, tasa de formación de blastocisto, tasa de embarazo clínico. Analizamos los datos obtenidos de ambos grupos mediante la Chi-cuadrado con la corrección de Yates.

RESULTADOS

	SCD (DFI)	Tasa de fecundación	Tasa de Blastocisto	Número ET	Embarazo
No patológico	15,67%	84,11%	61,95%	1,38095238	80,00%
Patológico	31,00%	68,20%	23,48%	2	50%
p	0.0117	0.0130	0.0001		0.0001



CONCLUSIONES

Los resultados que hemos obtenido muestran diferencias significativas

entre los dos grupos estudiados, con SCD patológico con el no patológico. Las tasas de fecundación, de blastocisto y de embarazo presentan diferencias

altamente significativas. Estos datos nos llevan a pensar que el resultado del SCD podría considerarse como valor predictivo del éxito de las TRA.

065: CONTROL DE CALIDAD EXTERNO MULTICÉNTRICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE VIH EN SEMEN LAVADO

I. Molina, MC. Gonzalvo, A. Rosales, AP. Ortiz, B. González, B. Romero, L. Martinez.
Unidad de reproducción, Hospital Universitario Virgen de las Nieves
e-mail: imoglez@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Las parejas serodiscordantes para el VIH-1, en las que el hombre es positivo recurrente, en determinadas circunstancias, a las técnicas de reproducción asistida para conseguir descendencia evitando la transmisión horizontal a la mujer. Para poder utilizar el semen de estos hombres, en determinados casos, es necesario que sea procesado para eliminar la presencia de VIH-1 y analizado posteriormente para confirmar la ausencia de partículas virales.

OBJETIVO

Valorar la calidad de diferentes laboratorios que realizan la determinación de VIH en semen.

METODOLOGÍA

En este control de calidad, organizado por CREATHe (Red de Centros de Técnicas

de Reproducción Asistida en VIH en Europa), se analizaron dos grupos de muestras, 6 ejemplares de plasma seminal y 5 ejemplares de células seminales. El rango de concentraciones de VIH incluía 1000, 500, 500, 200, 100 y 0 copias/ml en plasma seminal y para células seminales 1000, 500, 200, 100 y 0 copias/ 10^6 células. Se enviaron muestras a 18 laboratorios, 14 de los cuales remitieron sus resultados.

RESULTADOS

En el análisis cualitativo de plasma seminal el 100%, 79%, 79%, 71%, 50% y 100% de los laboratorios hicieron una detección correcta, respectivamente para las concentraciones anteriormente mencionadas. Respecto a la muestra de células seminales el 93%, 86%, 71%, 93% y 100% de los laboratorios hicieron una detección correcta, respectivamente para las concentraciones descritas. No

se encontraron falsos positivos, pero se observaron 25 falsos negativos en total (16 %) en ambos grupos de muestras (20% en plasma seminal y 11% en células seminales).

En el análisis cuantitativo se comprobó que la reproducibilidad entre-laboratorios es correcta con una desviación estándar (DE) por debajo de 0.5 Log y la reproducibilidad intra-laboratorio es correcta para la mayoría de los laboratorios (DE por debajo de 0.5 Log).

CONCLUSIÓN

La existencia de falsos negativos tanto en las muestras de plasma seminal como en las de células seminales, pone de manifiesto la necesidad de realizar un control de calidad externo en los laboratorios que determinan cualitativa y cuantitativamente VIH en semen.

066: REDUCCIÓN DE RIESGO DE TRANSMISIÓN DE HEPATITIS B, HEPATITIS C Y/O VIH MEDIANTE LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

I. Molina, MC. Gonzalvo, JA. Castilla, B. González, AP. Ortiz, J. Mozas, J. Fontes, MA. Calderón.
Unidad de reproducción, Hospital Universitario Virgen de las Nieves
e-mail: imoglez@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de reproducción asistida (TRA) con semen lavado pueden lograr un embarazo con un riesgo mínimo de transmisión vertical y horizontal del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), hepatitis C (VHC) y la hepatitis B (VHB) en parejas serodiscordantes. Además, las TRA pueden ofrecer también una reducción del riesgo de sobreinfección con nuevas cepas en parejas seroconcordantes.

OBJETIVOS

Evaluar la utilización de las TRA como opción segura para lograr un embarazo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio retrospectivo incluye a 93 hombres seropositivos para VIH, VHC o VHB que fueron sometidos a tratamientos de reproducción asistida en nuestro centro entre noviembre de

2005 y diciembre de 2009. El semen lavado fue testado para descartar la presencia de partículas virales. Las mujeres serodiscordantes no infectadas fueron evaluadas antes y después de cada tratamiento para comprobar la ausencia de anticuerpos contra VIH, VHC y/o VHB.

RESULTADOS

Se realizaron un total de 173 ciclos en 93 parejas. Fueron tratadas 33 parejas, en las que el hombre era seropositivo para VIH (23 de estos hombres eran también positivos para VHC, un hombre era positivo para VHB y otro positivo para VHC y VHB), 23 parejas con hombres seropositivos para VHC (uno era también positivo para VHB) y 37 parejas con hombres seropositivos para VHB. En total se obtuvieron 38 embarazos clínicos (22% por ciclo y un 40,9% por pareja) en 173 ciclos iniciados, y se produjeron 28 partos (16,2% por ciclo y un 30,1% por pareja), la tasa

de embarazo múltiple fue del 21.4%. Las tasas no muestran diferencias significativas en fecundación y tasas de embarazo en función de la infección. Como resultado del tratamiento se obtuvieron 34 recién nacidos (22 de embarazo único y 6 gemelos). De estos recién nacidos 8 fueron prematuros (<37 semanas), uno prematuro extremo (<32 semanas), 6 bebés nacieron con bajo peso (<2500 gramos) y uno con muy bajo peso (<1500 gramos). En el seguimiento no se detectó ninguna seroconversión en los 34 recién nacidos (analizados al nacimiento y a los 3 meses de edad), ni en las 93 mujeres tratadas.

CONCLUSIONES

El lavado de semen e ICSI ha demostrado ser una opción segura y eficaz para la reducción del riesgo de transmisión en parejas serodiscordantes o de superinfección en parejas concordantes que deseen tener un hijo.

067: ¿AFECTA EL IMC DE LA DONANTE O DE LA RECEPTORA A LOS RESULTADOS FIV/ICSI EN UN PROGRAMA DE DONACIÓN DE OVOCITOS?

A. Sánchez, D. Gumbao, J. Marcos, D. López, J. Landeras, B. Amorcho
Laboratorio FIV. IVI Murcia. Murcia
e-mail: leonana@hotmail.com

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.

METODOLOGÍA

Estudio retrospectivo realizado en el IVI-Murcia, del 1 de Enero de 2007 al 31 de Diciembre de 2008.

El IMC fue calculado mediante la fórmula: peso (Kg)/altura (m²).

Los ciclos fueron divididos en grupos según su 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 333 ciclos de donantes: 64 corresponden a aspiraciones foliculares de donantes con IMC < 20. Otros 186 ciclos correspondieron a donantes con IMC entre 20-24,9. Otros 549 a donantes con IMC entre 25-29,9. Las 24 restantes aspiraciones pertenecen a IMC ≥ 30.

Los datos referentes a las receptoras de óvulos fueron los siguientes:

Receptoras con IMC menor de 20 con 22 ciclos, 196 ciclos con IMC entre 20-24,9, 74 ciclos con IMC entre 25-29,9 y 36 ciclos correspondientes al grupo de IMC ≥ 30.

Se compararon 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 Fisher con valor significativo cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Un total de 3861 ovocitos fueron inseminados.

Los resultados son los que se recogen en las siguientes tablas.

DONANTES	Fecundación	Gestación	Implantación	Aborto
IMC <20	76.9%	41.4% (24/58)	27.27%	20.83% (5/24)
20 ≤ IMC <25	68.2%	51.2% (88/172)	33.2%	20.4% (18/88)
25 ≤ IMC <30	70.4%	62.9% (34/54)	44%	20.59% (7/34)
IMC ≥30	69.7%	54.2% (13/24)	38.64%	15.38% (2/13)

Tabla I: Tasas de fecundación, gestación, implantación y aborto de las receptoras cuyos ovocitos provienen de donantes de los 4 grupos diferenciados de IMC, independientemente del IMC de la receptora.

RECEPTORAS	Fecundación	Gestación	Implantación	Aborto
IMC <20	71.6%	47.4% (9/19)	38.7%	11.11% (1/9)
20 ≤ IMC <25	70.3%	55.5% (100/180)	36.9%	26% (26/100)
25 ≤ IMC <30	72.31%	49.3% (35/71)	33.1%	11.43% (4/35)
IMC ≥30	66.1%	40.63% (13/32)	46.9%	15.38% (2/13)

Tabla II: Tasas de fecundación, gestación, implantación y aborto de los 4 grupos diferenciados de receptoras independientemente del IMC de la donante de la que provienen sus ovocitos.

CONCLUSIONES

Refiriéndose a las donantes, tanto en la tasa de gestación como en la de implantación no se observan diferencias estadísticamente significativas, excepto en el grupo de IMC <20 donde se observa una menor tasa de gestación.

Respecto al grupo de las receptoras con un IMC entre 20-24,9, observamos una

tendencia a una óptima receptividad uterina, al contrario que en el grupo de IMC ≥30 donde se observa una tendencia a una baja 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 que grupo es de mejor

pronóstico reproductivo en un programa de donación de ovocitos.

068: PROGRESIÓN DE LOS RESULTADOS DE CRIOPRESERVACIÓN EMBRIONARIA DESPUÉS DE LA INTRODUCCIÓN DE LA VITRIFICACIÓN EN UN PROGRAMA DE FIV

A. García¹, O. López¹, O. Martínez-Pasarell¹, A. Mata¹, S. Peon² L. Bassas¹.

¹Laboratorio de Seminología y Embriología, Fundació Puigvert, ²Servicio de Ginecología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona
e-mail: agarcia@fundacio-puigvert.es

INTRODUCCIÓN

El éxito de las técnicas de reproducción se ve facilitada por la criopreservación de embriones. Durante los últimos años, la vitrificación ha sido reconocida como una alternativa ventajosa a la tradicional congelación lenta en embriología humana. Sin embargo, hay pocos datos disponibles publicados sobre la eficacia comparativa de las variantes técnicas de vitrificación.

OBJETIVO

El objetivo del presente estudio es evaluar nuestros resultados de la técnica de vitrificación (VT), como alternativa a la congelación lenta (CL) para la criopreservación de embriones producidos en una clínica del programa de FIV y comparar la eficacia de dos diferentes recipientes utilizados para la vitrificación de embriones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se aplicó un diseño prospectivo comparativo con asignación pseudo-aleatoria de los ciclos de FIV a los grupos de CL o VT. (día de la semana), desde 2008 hasta el final de 2010. Sólo los embriones con buena calidad morfológica (categorías A y B) fueron criopreservados en la etapa de división (D2 o D3). Para CL (132 ciclos, 546 embriones) se utilizó el sistema Freeze-kit (Vitrolife, EMB), pajuelas CBS, y un congelador programable (Planer 1.7, Telstar). La VT (338 ciclos, 1022 embriones) se realizó con Medicult Vitrification Cooling (Origio), utilizando pajuelas Cryoleaf (McGill, Medicult) hasta Mayo/2009, y posteriormente se pasó a usar pajuelas Cryotop (Kitazato, Durviz). La descongelación lenta (88 ciclos, n= 270 embriones)

se realizó con el Thaw-kit (Vitrolife, EMB), y la descongelación (187 ciclos, 460 embriones) repartidos entre el dispositivo de Cryoleaf (105 ciclos, n=253 embriones) y Cryotop (82 ciclos, 207 embriones), se realizó con Medicult Vitrification Warming (Origio), el día antes de la transferencia para evaluar el potencial de crecimiento de los embriones.

RESULTADOS

La tasa de supervivencia fue del 85% con CL y 87% con VT. El porcentaje de embriones en crecimiento fue del 59% (CL) y 65 % (VT). Una media de 1,8 y 1,6 embriones fueron transferidos, respectivamente, en el grupo de CL y VT. Las tasas de embarazo por transferencia fueron del 19% (CL) en comparación con el 26% (VT). Las tasas de implantación fueron del 12% (CL) y 17 % (VT). Todos los parámetros de eficacia clínica de VT mejoraron progresivamente para cada año natural, mientras que se mantuvieron estables con CL. Los embarazos múltiples en el grupo de CL fueron 6,2 %, y 16,7 % en el grupo VT. Cuatro embarazos (25%) de CL y 8 embarazos (19%) de VT terminaron en abortos. Con la CL se observaron tasas de embarazo por ciclo en D2 del 25%, mayores que en D3 (10%), mientras que con VT no hubo diferencias entre D2 (26%) y D3 (20%). Las tasas de gestación en ciclos en los que se descongelaron 1, 2 o ≥ 3 embriones previamente congelados con CL fueron, respectivamente, 0%, 14%, y 22%, mientras que en ciclos de VT fueron 11%, 28% y 25% al descongelar 1, 2 o ≥ 3 embriones.

Se comparó la eficacia de los dos tipos de pajuelas abiertas Cryoleaf y

Cryotop utilizados para la vitrificación de embriones mediante las tasas de gestación por transferencia (26% vs 25%), tasas de implantación (19% vs 15%) y tasas de aborto (13% vs 28%).

CONCLUSIONES

La progresión de los resultados clínicos de la vitrificación embrionaria puede documentarse mediante comparación continua con el método clásico de congelación lenta.

Los dos sistemas de pajuelas utilizadas para la vitrificación son equivalentes en eficacia, aunque se observa mayor número de abortos con Cryotop.

069: ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS TASAS DE IMPLANTACIÓN DE EMBRIONES MONONUCLEADOS Y EMBRIONES MULTINUCLEADOS EN D+2

M. Cuadros, L. Andrés Criado, M. Sánchez de Burgos, M. Morales Morales, E. Ricciarelli, J.L. Gómez Palomares, J. Martínez, J. Cuadros
Clínica de Medicina de la Reproducción y Ginecología FIVMadrid
e-mail: jcuadros@fivmadrid.es

INTRODUCCIÓN

La valoración morfológica de los embriones tiene dos variables comunes en todos los centros de reproducción asistida: el número de células y el grado de fragmentación. Además de estas dos características principales, a lo largo de los años diversos estudios han demostrado que el número de núcleos y la presencia de multinucleación tienen un importante valor predictivo de la viabilidad de los embriones. Sin embargo, debido a la baja frecuencia de multinucleación en los embriones seleccionados para las transferencias embrionarias, la tasa de implantación de dichos embriones resulta difícil de determinar.

OBJETIVO

En este estudio se comparan las tasas de implantación de embriones multinucleados frente a la de embriones mononucleados, para determinar la diferencia en la tasa de implantación en presencia o ausencia de multinucleación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron retrospectivamente 245 embriones transferidos en ciclos de FIV-ICSI en D+2. De éstos, 74 embriones presentaban al menos una célula binucleada (grupo de embriones multinucleados), 92 embriones presentaban un núcleo único en cada una de sus células (grupo de embriones mononucleados) y 79 presentaban algunas células con núcleo único. Para el análisis se incluyeron sólo los embriones multinucleados o mononucleados con implantación conocida (57 y 85 embriones, respectivamente). En el caso de una transferencia con dos embriones de la misma calidad que resultara en una implantación, se considera que uno de ellos es de implantación conocida. El análisis estadístico se realizó con el programa informático SPSS STATISTICS 17.0.

RESULTADOS

En el grupo de embriones multinucleados, 3 de los 57 embriones de implantación conocida dieron lugar a la

formación de un saco gestacional (tasa de implantación = 5,3 %). En el grupo de embriones mononucleados, 26 de los 85 embriones de implantación conocida dieron lugar a la formación de un saco gestacional (tasa de implantación = 30,6%). La diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significativa. ($p < 0,001$).

CONCLUSIÓN

Los resultados indican que los embriones que presentan multinucleación tienen una tasa de implantación significativamente menor que los embriones cuyas células poseen un núcleo único. Estos datos ponen de manifiesto hasta qué punto afecta la multinucleación el potencial implantatorio de los embriones, y la ventaja que supone la visualización de los núcleos para una mejor determinación de la calidad embrionaria y por lo tanto para una mejor selección de los embriones que van a ser transferidos.

070: SÍNDROME DE AICARDI-GOUTIÈRES. PRIMER CASO CON ÉXITO

C. Giménez¹, C. Arjona¹, A. Castellanos², D. Pascual², E. García-Guixé¹, A. Jiménez-Macedo¹, M. Sandalinas¹

¹Reprogenetics, Barcelona; ²Málaga FIV, Málaga
e-mail: litus@reprogenetics.es

INTRODUCCIÓN

El síndrome de Aicardi-Goutières (AGS) es una enfermedad rara que se transmite, mayoritariamente, siguiendo un patrón de herencia autosómico recesivo. Se trata de una encefalopatía subaguda hereditaria caracterizada por la asociación de calcificación de los ganglios basales,

leucodistrofia y linfocitosis del líquido cefalorraquídeo que en la mayoría de los casos debuta en los primeros días o meses de vida, si bien se han descrito formas más moderadas que aparecen después del año de edad. En el 80% de los casos graves, los niños mueren antes de los 10 años. Mutaciones en los genes TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B y RNASEH2C, son responsables de

la patología, correlacionándose las alteraciones en TREX1, RNASEH2C y RNASEH2A, con un fenotipo grave, mientras que mutaciones en RNASEH2B dan lugar a formas más moderadas.

OBJETIVOS

Describir el protocolo de diagnóstico genético preimplantacional (DGP) para

la detección del síndrome de Aicardi-Goutières (AGS) en una familia con descendencia afecta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Familia portadora de la mutación c.341G>A (p.Arg114His) en el gen *TREX1*.

Se desarrolló un protocolo de DGP específico para la familia en estudio que incluye: diseño y optimización de los cebadores que permiten amplificar la región donde se encuentra la mutación así como marcadores polimórficos, confirmación de la mutación en DNA genómico procedente de cada una de las muestras (progenitores e hija afecta), identificación de los haplotipos de riesgo y optimización de la PCR multiplex en célula única.

Una vez finalizado el trabajo en el laboratorio de genética se inició el ciclo de FIV-ICSI-DGP.

La biopsia se realizó en día +3 mediante la práctica de un orificio en la zona pelúcida con ácido Tyrodes y aspiración de blastómeros.

Se realizó un protocolo cuádruple de PCR que incluye una primera ronda multiplex de amplificación seguida

de una segunda ronda que amplifica cada una de las regiones implicadas por separado. Para la detección de la mutación se llevó a cabo una minisequenciación que permitió establecer la presencia/ausencia de la mutación.

Todos los productos de amplificación fueron analizados en un secuenciador automático.

RESULTADOS

Se diseñaron y analizaron 5 marcadores polimórficos (STR's) flanqueantes a la región de estudio. Dos de los 5 marcadores resultaron ser totalmente informativos y un tercero semi-informativo, por lo que los tres fueron seleccionados para el DGP.

El desarrollo del protocolo ofreció una tasa de amplificación del 95% con una tasa de ADO del 7%, por lo que se procedió a dar luz verde al inicio del ciclo de FIV.

Se obtuvieron 14 ovocitos, microinyectándose 10 MII que resultaron en 8 cigotos. Cinco de los 8 embriones fecundados evolucionaron adecuadamente hasta día +3, procediéndose a la biopsia de un único blastómero de cada embrión. Además,

se procesó una alícuota del medio de biopsia como blanco para cada uno de los embriones.

Se obtuvo resultado de todos los embriones resultando ser dos de ellos afectos, dos no afectos y uno portador. Se procedió a la transferencia de 2 embriones en día +5 de desarrollo, resultando en un embarazo gemelar que actualmente se encuentra en la semana 7 de gestación.

CONCLUSIONES

El DGP para enfermedades monogénicas requiere de una elevada especialización y experiencia que permita el desarrollo de protocolos aptos para prácticamente cualquier anomalía génica causante de una patología.

La aplicación de las técnicas de DGP molecular en parejas portadoras de enfermedades genéticas permite la transferencia de embriones libres de la enfermedad en estudio, evitando que la pareja deba enfrentarse a la decisión de interrumpir o no un embarazo afecto.

En nuestro conocimiento este es el primer caso de DGP con embarazo evolutivo para el síndrome de Aicardi-Goutières.

071: DIAGNÓSTICO GENÉTICO EN ESPERMATOZOIDES DE PACIENTES CON CARIOTIPO NORMAL. RESULTADOS EN 507 CASOS

A. R. Jiménez-Macedo, E. García-Guixé, C. Giménez, M. Sandalinas
Reprogenetics, Barcelona
e-mail: pgdteam@reprogenetics.es

INTRODUCCIÓN

Durante el proceso de gametogénesis humana es frecuente que se produzcan errores meióticos. Estos errores pueden provocar aneuploidías en los gametos y ser transmitidas a la descendencia provocando fallos de implantación embrionaria, abortos, o descendencia afecta.

El Diagnóstico Genético en Espermatozoides (DGE) mediante la técnica de FISH (Fluorescent *In Situ*

Hybridization) en espermatozoides es una herramienta muy útil para el estudio de los gametos masculinos, ya que proporciona una estimación del riesgo de anomalías cromosómicas que podemos encontrar en los embriones derivados de la fecundación con esta población espermática.

OBJETIVOS

Estudio de los resultados obtenidos en el análisis de anomalías cromosómicas

en espermatozoides de pacientes con cariotipo normal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se procesaron mediante FISH 507 muestras de espermatozoides de pacientes con cariotipo normal que acudían a TRA por problemas de fertilidad y/o esterilidad. Se aplicaron sondas para los cromosomas X, Y, 13, 14, 15, 18, 20, 21 y/o 22.

Las muestras analizadas se clasificaron en función de los parámetros seminales siguiendo valores de referencia de la OMS 2010.

RESULTADOS

De los casos estudiados, el 20.71% resultaron en DGE alterado (DGEALT) y el 79.29% en DGE normal. De los pacientes con Oligozoospermia (O) el 33.3% presentaban el DGEALT, el 14.06% de los individuos con Astenozoospermia (A), el 18.35% del grupo de Teratozoospermia, el 30% de los pacientes Oligoastenospermicos (OA), el 25% de los OligoTeratozoospermicos (OT), el 25% de los AstenoTeratozoospermicos

(AT), el 29.03% de pacientes con OligoAstenoTeratozoospermia (OAT) y el 14.97% de los pacientes normozoospermicos (N).

De los casos con DGEALT, el 92.38% de los casos hubieran sido detectados analizando únicamente los cromosomas: X, Y y 21. De los 8 casos con DGEALT (7.7%) restantes en los que no estaban implicados estos tres cromosomas, 6 casos presentaban disomía para el cromosoma 18, y 2 casos para el cromosoma 13. Por lo que todos los casos con DGEALT hubieran sido detectados analizando únicamente los cromosomas X, Y, 13, 18 y 21.

CONCLUSIÓN

Según nuestro grupo de estudio, más del 20% de los pacientes con cariotipo normal que se realizan una FISH de espermatozoides por problemas de fertilidad tienen un incremento significativo de aneuploidías en sus gametos. La totalidad de los casos de FISH con un resultado alterado presentan alguno de los cromosomas: X, Y, 13, 18 y/o 21 alterado por lo que en este estudio la aplicación de un DGE de estos 5 cromosomas sería suficiente para detectar la totalidad de las muestras cromosómicamente alteradas.

072: INFLUENCIA DE LOS DIAS DE ABSTINENCIA EN LOS RESULTADOS DE UN CICLO DE FECUNDACION IN VITRO (FIV)

I. Pons, R. Cercas, C. Villas, C. Braña, S. Fernández-Shaw
URH García del Real, Madrid
e-mail: ipons@urh.es

INTRODUCCIÓN

Diferentes estudios apuntan que una fragmentación elevada en el ADN de espermatozoides puede ser perjudicial para la consecución de un embarazo a término.

En este trabajo sugerimos que se puede disminuir el porcentaje de fragmentación de los espermatozoides disminuyendo los días de abstinencia y que esta disminución puede mejorar las tasas de embarazo a término.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio fue evaluar prospectivamente la influencia de los días de abstinencia en los resultados de un ciclo de FIV.

MATERIALES Y MÉTODOS

En abril 2009 comenzamos un estudio prospectivo randomizado en 160 primeros ciclos de FIV/ICSI que se dividieron en dos grupos. Grupo 1:

(N=77) ciclos en los que el varón obtuvo la muestra de semen para el ciclo de FIV tras un día de abstinencia. Grupo 2: (N=83) ciclos en los que el varón obtuvo la muestra para el ciclo de FIV tras la abstinencia sexual que recomienda la OMS (3-7 días).

El análisis estadístico empleado fue Chi cuadrado, Test exacto de Fisher o T de student según el caso. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando $P < 0.05$.

RESULTADOS

Ambos grupos fueron estadísticamente homogéneos para las variables analizadas.

La tasa de embarazo fue superior en el grupo 1 que en el grupo 2 (53.2% vs. 50.6%, $P > 0.05$), la tasa de aborto fue inferior en el grupo 1 que en el grupo 2 (7.3% vs. 14.3%, $P > 0.05$), y por ello la tasa de embarazo evolutivo fue superior en el grupo 1 que en el grupo 2 (49.4% vs. 42.2%, $P > 0.05$), aunque

ninguna de estas diferencias fueron estadísticamente significativas.

CONCLUSIONES

Los resultados de un ciclo de FIV/ICSI parecen tener una ligera mejoría si se usan muestras de semen tras un día de abstinencia.

Es necesario aumentar el número de casos para observar si se confirma estadísticamente esta tendencia.

073: UNA DISTANCIA ANOGENITAL ACORTADA PREDICE BAJA CALIDAD SEMINAL EN VARONES JÓVENES

J. Mendiola^{1,2}, R.W. Stahlhut¹, N. Jørgensen³, F. Liu^{1,4}, S.H. Swan^{1,4}

¹Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine and Dentistry, University of Rochester, NY, USA. ²Grupo de Investigación en Salud Pública y Epidemiología, Unidad de Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Espinardo (Murcia). ³University Department of Growth and Reproduction, Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark. ⁴Mt. Sinai School of Medicine, New York, NY, USA.
e-mail: jaime.mendiola@um.es

INTRODUCCIÓN

En roedores macho, la distancia anogenital (AGD) es un marcador preciso de la exposición a andrógenos en el ambiente intrauterino y predice la capacidad y función reproductiva en la etapa adulta. Diversas sustancias antiandrogénicas medioambientales pueden interferir en la síntesis *in utero* de hormonas androgénicas y alterar el desarrollo del tracto reproductivo masculino, incluyendo un acortamiento de la AGD. No se conoce todavía si la AGD está relacionada con la función reproductiva en varones humanos.

OBJETIVOS

Examinar las asociaciones entre la AGD y los parámetros seminales en varones adultos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 126 alumnos universitarios que participaron en el *Rochester Young Men's Study* (RYMS), Rochester (NY, EE.UU.), entre los años 2009 y 2010. A los varones que aceptaron participar en el estudio se les realizó una exploración andrológica, obtuvieron una muestra

seminal y cumplimentaron una encuesta epidemiológica. Las muestras seminales fueron evaluadas siguiendo los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1999). Se utilizaron modelos de regresión multivariante para examinar la concentración, movilidad y morfología espermática en relación con dos medidas de AGD, a saber: la distancia desde la base posterior del escroto al ano (AGD_{AS}), y la distancia desde la inserción posterior del pene al ano (AGD_{AP}). Las siguientes variables se incluyeron en los modelos finales para ajustar por posibles factores de confusión: edad, altura, tabaquismo, grupo étnico, estación del año y tiempo de abstinencia sexual. Los análisis se realizaron con los programas de análisis estadístico SPSS v18.0 y SAS v9.0.

RESULTADOS

La AGD_{AS} se asoció significativa y positivamente con todos los parámetros espermáticos (concentración, movilidad, morfología, número total de espermatozoides y número total de espermatozoides móviles) con p-valores entre 0,002 y 0,048. Los varones con una AGD_{AS} por debajo (comparado con por encima) de la mediana presentaron

7.3 veces más riesgo (IC 95% 2,5, 21,6) de tener una concentración espermática baja (<20 millones/ml). La concentración espermática media (ajustada) para un varón en el cuartil 25 de la distribución de la AGD_{AS} fue de 34,7 millones/ml, comparado con 51,6 millones/ml que presentó un varón en el cuartil 75 de la distribución. Sólo se vieron asociaciones débiles y no significativas entre los parámetros espermáticos y la AGD_{AP}.

CONCLUSIONES

En nuestra población, la AGD_{AS} presentó una fuerte asociación con todos los parámetros espermáticos y es un predictor de baja calidad seminal. En modelos animales, la AGD de machos al nacimiento refleja los niveles androgénicos prenatales durante la ventana de programación de masculinización (*masculinization programming window*) y predice la AGD y la función reproductiva adulta. Por tanto, nuestros resultados sugieren que el ambiente androgénico durante el periodo fetal temprano ejerce una influencia fundamental sobre la AGD y la calidad seminal en humanos, como se ha demostrado en modelos animales.

074: INFLUENCIA DEL ÍNDICE DE MASA CORPORAL (IMC) EN LA CALIDAD SEMINAL

A. Yoldi; A. Vaquero; JP. Ramírez y JA. Castilla.
CEIFER. (Centro de Estudios e investigación de la Fertilidad). Granada
e-mail: alberto.yoldi@ceifer.com

INTRODUCCIÓN

El índice de masa corporal (IMC) se define como: $\text{Peso (kg)} / \text{Altura}^2 \text{ (m)}$, y según la OMS existen 5 categorías:

Categorías IMC	Grado	Intervalo
Bajo peso	1	< 18.5
Peso normal	2	18.5 a 24.9
Obesidad grado.1	3	25 a 29.9
Obesidad grado. 2	4	30.0 a 39.9
Obesidad mórbida. Grado. 3	5	40.0 ≤

Existen publicaciones en la literatura científica acerca de la influencia que presenta el IMC en la reproducción humana. Una gran cantidad de estos estudios se basan en parejas sometidas a TRA, enfocándose el estudio hacia el factor femenino.

OBJETIVOS

relacionar las diferentes categorías del IMC con las variables de calidad seminal y conocer su influencia sobre las mismas.

MATERIAL Y MÉTODOS

De cada aspirante a donante de semen que ha acudido a nuestro centro entre los años 1993 a 2010, se ha estudiado una muestra seminal obtenida por masturbación con un período de abstinencia de 3-5 días (n=2444). Para el análisis del semen se han seguido los procedimientos estándar

definidos por el Manual OMS, en sus diferentes ediciones. Se ha empleado un microscopio de contraste de fases atemperado a 37°C. El personal investigador está 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. La edad media de la muestra es de 22.17 años (± 4.18 SD).

Las características seminales analizadas han sido: concentración, volumen, nº total de espermatozoides en eyaculado, % espermatozoides progresivos (A+B) y % de morfología normal.

RESULTADOS

Hemos excluido el grado 5, al tener un único individuo representativo. Tras eliminar los *outliers* mediante el método del recorrido intercuartílico, la muestra presenta la siguiente estadística descriptiva:

Mediante el test de normalidad Kolmogorov-Smirnov apreciamos que ninguna de las variables estudiadas presenta una distribución normal; por lo tanto tendremos que utilizar métodos no paramétricos para estudiar la serie.

Al aplicar el test de Kruskal-Wallis, vemos que sólo el nº total de espermatozoides por eyaculado presenta una disminución significativa conforme aumenta el IMC (sig.=0.002).

CONCLUSIONES

La calidad seminal en una muestra de 2444 jóvenes aspirantes a donante de banco de semen disminuye conforme aumenta el índice de masa corporal (IMC). Esta disminución presenta significación estadística tan sólo en una de las cinco variables seminales estudiadas (nº total de espermatozoides por eyaculado).

	IMC.1			IMC.2			IMC.3			IMC.4		
	n	\bar{x}	sd	n	\bar{x}	sd	n	\bar{x}	sd	n	\bar{x}	sd
Conc.(10 ⁶ /ml)	27	85.3	48.99	1854	77.7	48.28	439	72.4	43.99	41	70.4	49.26
Vol. (ml)	27	3.7	1.12	1852	3.7	1.49	424	3.6	1.36	40	3.1	1.22
Total (10 ⁶)	27	297.3	158.01	1829	263.9	170.18	425	242.8	161.46	38	182.8	132.33
Prog (%)	26	45.9	13.49	1795	46.6	12.63	445	45.4	15.57	40	43.4	15.50
Norm (%)	4	14.5	11.59	368	16.5	6.69	84	17.4	6.29	4	16.0	1.41

075: USO DE LA METABOLÓMICA PARA LA SELECCIÓN EMBRIONARIA EN D+2 Y D+3

M. Morales Morales, L. Andrés Criado, M. Sánchez de Burgos, M. Cuadros, E. Hernández, J.L. Gómez Palomares, J. Cuadros
 Clínica de Medicina de la Reproducción y Ginecología FIVMadrid
 e-mail: jcuadros@fivmadrid.es

INTRODUCCIÓN

Aunque el análisis del metabolismo del embrión para determinar su viabilidad no es reciente, su aplicación práctica

en el laboratorio de embriología sí es novedosa. Esta información sería complementaria a la que obtenemos a partir de la valoración de la morfología de los embriones.

Viametrics-E utiliza un algoritmo matemático que genera un *score* de viabilidad en función de la concentración de grupos funcionales (-CH, -OH, -NH) en el medio de cultivo

en el que se han desarrollado los embriones, mediante espectroscopía del infrarrojo cercano. Teóricamente, el *score* de viabilidad predeciría cuáles de los embriones tendrían un mayor potencial de implantación.

OBJETIVO

En este estudio preliminar valoramos si el uso de Viametrics-E aumenta la probabilidad de embarazo en nuestro programa de FIV-ICSI.

MATERIAL Y MÉTODOS

Comparamos ciclos en los que se ha transferido embriones seleccionados por su mayor *score* de viabilidad, después de una selección morfológica, versus ciclos en los que se ha transferido embriones seleccionados sólo por su morfología.

En el grupo experimental, hemos analizado con Viametrics-E los embriones en D+2 o D+3 de 28 ciclos de mujeres de 38 años o menos, en los cuales los embriones fueron preseleccionados por su morfología y se midió el *score* de viabilidad a los mejores embriones, transfiriendo los de *score* más alto. Como grupo control, hemos analizado 13 ciclos de características similares a las del grupo experimental, donde se transfirieron embriones en D+2 o D+3 en mujeres de 38 años o menos, en los cuales los embriones se seleccionaron únicamente por su morfología.

RESULTADOS

En el grupo experimental, de las 28 transferencias, 14 fueron pruebas de embarazo positivas (50 %) y 11 embarazos clínicos (39,3 %). En el grupo control, de 13 transferencias realizadas,

7 fueron pruebas de embarazo positivas, todas ellas embarazos clínicos (53,8 %). Utilizando el test de Chi-cuadrado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

CONCLUSIÓN

En este estudio preliminar, no encontramos que el uso del *score* de viabilidad de Viametrics-E aumente las tasas de embarazo. Concluimos que la valoración morfológica sigue siendo la herramienta principal para la determinación de la viabilidad embrionaria, y consideramos necesaria la revisión de los planteamientos para la aplicación práctica de la metabolómica en la clínica, para hacer de su uso una realidad a corto plazo.

076: ANÁLISIS DEL GROSOR DE LA ZONA PELÚCIDA SEGÚN LAH (LASER ASSISTED HATCHING) O NO EN CICLOS DE FIV/ICSI EN 2 GRUPOS DE EDADES

B. Amoroch, G. Calderón, A. Sánchez, J. Marcos, P. Albero, L. Fernández, M. Nicolás, J. Landeras
IVI Murcia
e-mail: beatriz.amoroch@ivi.es

INTRODUCCIÓN

El *Hatching* Asistido (AH) es una técnica usada para facilitar el proceso de la eclosión en embriones pertenecientes a pacientes de peor pronóstico reproductivo (Schoolcraft y cols.1994), edad avanzada, fallo de implantación (Stein y cols), embriones congelados (Gabrielsen y cols. 2004). Sin embargo, existen otros grupos que aportan información en contra de la técnica como Lazendorf y cols. 2008 y el grupo de Kutlu en 2010. Son muy pocos los estudios publicados enfocados a la medición de la zona pelúcida y el posterior análisis como Sun en 2005 y Hagemann en 2010,

pero los grupos de edades estudiados son menores de 38 años.

En un estudio de Amoroch y cols. en 2011 se obtienen la evidencia del beneficio del LAH en el grupo de pacientes de 38-40 años de edad.

OBJETIVOS

El objetivo de este estudio es analizar si el grosor de la zona pelúcida de los embriones transferidos en día 3 de desarrollo tiene alguna influencia sobre el beneficio del LAH en ciclos de FIV/ICSI en 2 grupos de edades y valorar éxito reproductivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio prospectivo y randomizado, realizado en el IVI-Murcia, entre el 1 de Marzo de 2006 y el 28 de Febrero de 2011. Se estudiaron 213 ciclos FIV/ICSI realizados en mujeres ≥ 38 años, que de forma aleatoria fueron distribuidos en 2 grupos: A 107 ciclos se les realizó LAH (Grupo LAH) y a los 106 ciclos restantes no se les realizó LAH (Grupo No LAH). Dentro de estos dos grupos se subdividió la población en dos grupos de edades: 38 -39 años y ≥ 40 años.

En todos los grupos se registró la media de la zona pelúcida de los embriones a

transferir a en D3 de desarrollo, y de acuerdo con la literatura subdividimos de nuevo la población en < 15 y ≥ 15 μm .

Para realizar el LAH se usó el sistema Octax *laser shot* cuando les correspondía el *Assisted Hatching*.

Los grupos fueron homogéneos en cuanto a IMC, edad, calidad embrionaria y número de embriones transferidos/ciclo.

El análisis estadístico se realizó con el test de Fisher con valor significativo cuando $p < 0.05$.

CONCLUSIONES

A la vista de los resultados, sí encontramos beneficio del LAH en el grupo de edad comprendido entre 38-39, cuando estratificamos la población de estudio en función del grosor de la zona pelúcida.

Resultados por grupos de pacientes según edad y No LAH

No LAH	$< 15 \mu\text{m}$		$\geq 15 \mu\text{m}$	
	38 y 39 años	≥ 40 años	38 y 39 años	≥ 40 años
Casos	22	8	56	20
Tasa Gestación	18,5 %	0%	30,4%	45%
Tasa Implantación	10%	0%	23,2%	28%
Tasa Aborto	0%	0%	23,5%	33%

Resultados por grupos de pacientes según edad LAH

LAH	$< 15 \mu\text{m}$		$\geq 15 \mu\text{m}$	
	38 y 39 años	≥ 40 años	38 y 39 años	≥ 40 años
Casos	21	6	44	36
Tasa Gestación	33,0 %	16,7%	50,0%	19,4%
Tasa Implantación	24,0%	8,3%	20,0%	11,1%
Tasa Aborto	14,2%	0%	27,0%	0%

077: EL N° DE EMBRIONES IMPLANTADOS AFECTA AL RESULTADO DE LA GESTACIÓN

E. Vidal, S. Cívico, M. Guimerà, V. Moreno, JM. Calafell, N. Brandí, J. Balasch
Hospital Clínic de Barcelona
e-mail: evidal@clinic.ub.es

INTRODUCCIÓN

El objetivo principal en los tratamientos de fecundación in vitro (FIV) es la consecución de un embarazo cuyo resultado sea el nacimiento de un niño sano. Con el fin de incrementar las probabilidades de embarazo, la práctica habitual en FIV es la transferencia de más de un embrión. Por otra parte, la

tasa de gestación múltiple aumenta con el número de embriones transferidos, considerándose este hecho como uno de los efectos adversos en los tratamientos de reproducción asistida. La transferencia de un único embrión evitaría el riesgo de embarazo múltiple, pero reduciría significativamente la probabilidad de éxito en términos de embarazo (Cochrane, 2009; McLernon

et al., 2010). Además, diversos trabajos (Torsky et al, 2005; Glujovsky et al, 2007) sugieren que la transferencia de más de un embrión, podría favorecer el proceso de implantación y la tasa de niños nacidos, que se explicaría por una relación de sinergismo o cooperación entre los embriones.

OBJETIVOS

Analizar la evolución de los embarazos obtenidos en nuestro programa de FIV en función del número de sacos gestacionales observados en el primer control ecográfico

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo desde el año 1998 al 2009, que comprende un total de 2283 gestaciones clínicas de pacientes de FIV, divididas en dos grupos de estudio

Grupo 1: Edad ≤ 35 años

	Total Gestaciones	Abortos 1r trimestre	Gestaciones Con algún nacido vivo
	1438 (63%)	170 (11,8%)	1212 (84,3%)
Gestaciones únicas	951 (67%)	148 (15,6%)	760 (80%)
Gestaciones dobles	486 (29,3%)	22 (4,53%)	450 (92,6%)

Grupo 2: Edad ≥ 36 años

	Total Gestaciones	Abortos 1r trimestre	Gestaciones Con algún nacido vivo
	845 (37%)	209 (24,7%)	602 (71,2%)
Gestaciones únicas	636 (75,3%)	190 (29,9%)	419 (65,9%)
Gestaciones dobles	209 (24,7%)	19 (9,1%)	184 (88%)

en función de la edad : Grupo 1: edad ≤ 35 años (63,61%); Grupo 2: ≥ 36 años (36,39%). En ambos grupos, se registró el número de implantaciones únicas y dobles diagnosticadas mediante ecografía (6-7 semanas de gestación), la tasa de aborto clínico, de nacido vivo y los resultados neonatales.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en los dos grupos del estudio se detallan a continuación:

CONCLUSIONES

La probabilidad de tener un nacido vivo en FIV aumenta cuando se produce una implantación embrionaria doble. Este efecto destacaría especialmente en el grupo de mujeres mayores de 35 años.

078: EFECTO DE LA EXPANSIÓN EN EL GEN FMR1 (X-FRÁGIL) SOBRE LA RESPUESTA OVÁRICA

Lledó B., Guerrero J., Ortiz JA, Morales R., Ten J., Giménez J., Llácer J., Bernabeu R.
 Instituto Bernabeu
 e-mail: blledo@institutobernabeu.com

INTRODUCCIÓN

El síndrome de X-frágil es la causa más frecuente de retraso mental después del S. de Down, encontrándose asociado con fallo ovárico precoz (POF). Está causado por una expansión dinámica CGG en el gen FMR1 localizado en el cromosoma X. Un número elevado de repeticiones CGG en el gen FMR1 supone una mayor predisposición al POF. Se han evidenciado formas menos severas de POF con rangos intermedios de repeticiones. Gleicher et al considerando la hormona anti-

Mülleriana mostró una relación directa entre el número de repeticiones (35-55) y la reserva ovárica.

El objetivo de este estudio es comprobar si las repeticiones CGG en el gen FMR1 tienen valor predictivo de la respuesta ovárica tras tratamientos con gonadotropinas, en ciclos de ovodon.

MATERIALES Y MÉTODOS

En nuestro centro desde 2008 se realiza cribado de x-frágil de forma rutinaria en todas nuestras donantes de ovocitos. En

este estudio incluimos los resultados de X-frágil de 204 donantes (141 controles y 63 grupo estudio). La población de estudio se dividió en 3 subgrupos: mujeres con 35-39 repeticiones (n=34), 40-45 (n=12) y >45 (n=17).

El protocolo de estimulación ovárica para las donantes combina rFSH (150 o 225), antagonista (Cetrorelix) y análogo (Triptorelina) para provocar el pico de LH.

El test molecular se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones del kit comercial (Abbott Fragile X PCR Kit®). El alelo con

menor número de repeticiones se designó como el alelo-1. Todos los estudios estadísticos se realizaron en base al alelo-2 empleando el software SPSS y el test chi-cuadrado asumiendo varianzas iguales y una significación de 0.05.

RESULTADOS

No se observan diferencias significativas en los resultados del ciclo (tasas de beta-HCG, aborto, y embarazo evolutivo) entre los grupos control y estudio y los diferentes subgrupos. La tasa de embarazo fue del 47% para el grupo control vs 54% para el grupo de estudio. Respecto a la estimulación ovárica no se observan diferencias en la edad de la donante y el número de ovocitos recuperados entre la población control y la de estudio y los diferentes subgrupos. Las donantes del grupo

control requieren más gonadotropinas (2212 IU) que el grupo de estudio (1850 IU) e independientemente del subgrupo (1846 para 35-39; 1959 para 40-45 y 1779 para >45). Los días de estimulación para las mujeres del grupo control fue de 11.40 vs 9.82 para el grupo de estudio. Sólo los subgrupos 35-39 (9.6) y 40-45 (9.8) mostraron diferencias significativas. Estos resultados difieren de los trabajos publicados en pacientes infértiles.

DISCUSIÓN

Por primera vez presentamos datos que muestran la correlación entre los alelos normales e intermedios en el gen FMR1 y la estimulación ovárica empleando un modelo que no introduzca variables de confusión como el programa de donación de ovocitos.

Nuestros datos muestran que la estimulación ovárica no se ve afectada por el número de repeticiones en el rango intermedio y normal. El número de ovocitos recuperados y los resultados del ciclo no se ven influenciados por el número de repeticiones CGG. Por el contrario a estudios previos, se necesitan menos gonadotropinas y días de estimulación en mujeres con 35-45 repeticiones CGG en el gen FMR1.

Considerando estos resultados, los alelos en el rango intermedio y normal de repeticiones CGG no se puede emplear como predictores de la estimulación ovárica. Sin embargo, considerando la gravedad del síndrome de x-frágil y la frecuencia de portadoras, el cribado en las candidatas de donación es necesario.

079: ESTUDIO DE ANEUPLOIDÍAS ESPERMÁTICAS MEDIANTE HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH) EN DONANTES DE SEMEN

F. Marina, R. Alcolea, M. Rafael, M. Domínguez, L. Jiménez, A. Hernández y S. Marina
Instituto de Reproducción CEFER. ANACER.
e-mail: info@institutocefer.com

INTRODUCCIÓN

Los bancos de semen cada vez necesitan dar más garantías a las pacientes. Además del *screening* obligatorio por ley, se han ido introduciendo nuevos test para aumentar la seguridad de las muestras de semen utilizadas por los pacientes que requieren donación de gametos. Se han introducido nuevos test infecciosos, como la detección de clamidias o de citomegalovirus y test genéticos como la detección del gen de la fibrosis quística, la beta-talasemia y el cariotipo. Es conocido que en estudios prenatales de mujeres de pacientes con recuentos espermáticos bajos, hay un aumento en las anomalías cromosómicas *de novo* (Bonduelle et al., 2002 HR 17:2600). Los padres de niños con estas anomalías *de novo* sabemos que muestran incrementos significativos de aneuploidías espermáticas. Los estudios de FISH en

semen que realizamos en pacientes con parámetros seminales por encima de los límites inferiores de referencia según el manual de la OMS (2010) muestran que el 10,5% de ellos están alterados. Desde el año 2009 hemos incorporado el estudio de aneuploidías espermáticas en los donantes de semen para investigar la incidencia de alteraciones en este colectivo y para ofrecer una mayor seguridad a las usuarias del banco de semen.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudiamos un total de 380 donantes, con edad entre 18 y 30 años y aceptados para todas las otras pruebas de *screening*. Para el estudio de FISH se fijaron los espermatozoides con Carnoy y posteriormente se descondensaron las cabezas con DTT (dithiotreitol). Se utilizó el kit Vysis® Aneuvision compuesto por tres sondas

centroméricas (para los cromosomas 18, X e Y) y dos específicas de *loci* (para los cromosomas 13 y 21). Se estudiaron un mínimo de 1000 espermatozoides para cada grupo de sondas. Para el grupo control se estudiaron 10 donantes con fertilidad probada en los que se contaron 10.000 espermatozoides para cada grupo de sondas.

RESULTADOS

En los 380 donantes estudiados, el volumen medio de eyaculado fue $4,3 \text{ mL} \pm 1,5$ (2,1-10,8); la media de espermatozoides normales fue $29\% \pm 10$ (16-73); el recuento de espermatozoides/mL medio fue $94,2 \times 10^6 \pm 47 \times 10^6$ (21-286); la media del porcentaje de espermatozoides con movilidad traslativa fue $52,6\% \pm 9,1$ (19-73). Cuatro donantes presentaron incremento significativo de aneuploidías 1,0% (4/380).

CONCLUSIONES

La incidencia de aneuploidías espermáticas encontrada en los donantes es inferior a la que encontramos en los pacientes estériles con parámetros seminales por encima de los valores mínimos de referencia (1,0% vs 10,5%). La incidencia de donantes con alteraciones es baja, pero sabemos que pacientes con el FISH

alterado, presentan un mayor riesgo de generar descendencia con anomalías cromosómicas *de novo*. Las muestras de donantes son utilizadas por muchas pacientes hasta que se consiguen los 6 nacimientos marcados por la ley. Si no realizáramos este estudio, un donante aceptado que presente FISH espermático alterado podría haber sido utilizado en muchas pacientes. Se reducirían las posibilidades de gestación de estas

pacientes y se incrementaría el riesgo de abortos o de cromosomopatías en la descendencia. Consideramos justificable la realización del estudio de aneuploidías espermáticas en donantes de semen para proporcionar una mayor seguridad a los pacientes, en especial a aquellos que no consiguen gestación con semen del cónyuge y pasan a usar semen de donante.

O80: EXPRESIÓN DE LA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA 1A2 (ALDH1A2) EN CÉLULAS DEL CÚMULUS (CC) MEDIANTE ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL: POSIBLES IMPLICACIONES EN LA MADURACIÓN OVOCITARIA.

V. García-Láez, D. Beltrán, C. Albert, J. Horcajadas, F.J. Esteban, J.A. Martínez-Conejero, M.J. De los Santos
IVI Valencia - INCLIVA
garcialaez@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La aldehído deshidrogenasa (ALDH1A2) es la enzima que cataliza la formación del ácido retinoico (AR), forma metabólica activa de la vitamina A. ELAR es importante durante la formación de los folículos primordiales en humanos, induciendo la entrada en meiosis de las oogonias. Además, en otros modelos animales, podría tener cierta importancia en la maduración citoplasmática del ovocito. De hecho, también se ha encontrado la expresión de receptores de AR en las CC, así como un aumento de la concentración de AR en los líquidos foliculares de folículos dominantes comparados con los atrésicos, lo cual se encuentra correlacionado positivamente con la concentración de estradiol (E2).

OBJETIVO

El objetivo de este estudio consistió en evaluar las diferencias de expresión génica mediante *microarrays* entre donantes sometidas a ciclos naturales y estimulados y su posible correlación con los niveles de estradiol intrafoliculares, calidad ovocitaria y potencial de fecundación.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se incluyeron 4 donantes sometidas a ciclo natural

(CN) y 4 sometidas a protocolos de hiperestimulación ovárica (CE) con agonistas de GnRH y con FSH recombinante. La media de edad entre los dos grupos fue similar (27,2 vs 26,0).

Después de la extracción del ARN de las CC con Trizol, se realizó su amplificación lineal mediante el WT-Ovation Pico RNA Amplification System (NuGEN Technologies). El ADNc se hibridó con el Whole Human Genome Oligo Microarray (Agilent Technologies). El análisis de imagen se realizó mediante el Software GenePix Pro 6.0. Para las comparaciones se utilizaron tests no paramétricos. Los genes fueron considerados como sobre o infra-expresados cuando la $p < 0.05$ y el $\text{fold change} > 2$. La validación de los *microarrays* fue realizada un total de 19 CC adicionales mediante qRT-PCR.

Además se evaluó la presencia y posición del huso meiótico mediante el software de imagen Oosight, se realizaron medidas de birrefringencia y se hizo un seguimiento de los datos de fecundación de cada ovocito. Por último, se realizaron mediciones hormonales intrafoliculares de E2 mediante MEIA (análisis inmunoensayo enzimático de micropartículas). Para los análisis estadísticos fue usado el

test Chi-cuadrado considerándose significativa una $p < 0.05$.

RESULTADOS

Los resultados del *microarray* mostraron que la estimulación ovárica induce la activación o desactivación de determinados genes (7 sobre y 10 infra-regulados), mostrando por primera vez la expresión del gen ALDH1A2 en las CC siendo éste sobre-expresado en los CN con un *fold change* de 4.62 y un *p*-valor corregido de 0.025, demostrando también su asociación con un aumento intrafolicular de E2 (562.000 en CN vs 241.750 pg/ml en CE). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los CE y CN en la correcta posición y estado del huso meiótico (66.7% vs 46.7%), birrefringencia (1.77nm vs 1.31nm) y datos de fecundación (66.6% vs 59.4%), respectivamente.

CONCLUSIONES

La mayor expresión del gen ALDH1A2 observada en los CN mostró una relación con los niveles de E2 intrafolicular, sin embargo, esto no se correlacionó con parámetros de maduración ovocitaria como presencia de huso meiótico o potencial de fecundación.

081: COMPARACIÓN DEL DIAGNÓSTICO SEMINAL EMPLEANDO LOS VALORES DE REFERENCIA DE LA OMS 1999 Y 2010: DISTRIBUCIÓN EN FUNCIÓN DE LA ACTIVIDAD FÍSICA E ÍNDICE DE MASA CORPORAL

Delgado E¹, Guarnizo MC¹, Morgado S², Sánchez-Correa B², Roncero RG², Gordillo JJ² Mijares J³, De Julián J¹, Tarazona R², Casado JG^{2,3}
¹Norba, Ginecología y Reproducción S.L., Cáceres, España. ²Universidad de Extremadura, Departamento de Fisiología, Área de Inmunología, Cáceres, España. ³Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, Terapia Celular, Cáceres, España.
 e-mail: elenadelnie@clinicenorba.com

INTRODUCCIÓN

El aumento de la infertilidad masculina en los últimos años a hecho necesario revisar los valores de referencia que utilizamos para diagnosticar un semen como normal. Dichos valores publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) se obtienen de los datos recopilados de un elevado número de muestras de sémenes de individuos cuyas parejas se embarazaron en un plazo máximo de 12 meses. Estos valores se han revisado en 2010 en el quinto manual de la OMS y principalmente el número, la movilidad, la morfología y la recuperación espermática han disminuido de manera considerable. Los cambios socioeconómicos y la adquisición de nuevos hábitos de vida podrían ser las causas que expliquen este descenso. La dieta y el ejercicio físico son parámetros importantes en el individuo que afectan directamente a la fisiología del testículo. De hecho, una de las consecuencias de la mala alimentación es el aumento de la obesidad en los últimos años que podría considerarse como un factor asociado a la infertilidad masculina.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue analizar la influencia del deporte y del índice de masa corporal (IMC) sobre la calidad espermática y comparar los resultados obtenidos según los valores publicados por la OMS en 1999 y en 2010.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras se obtuvieron de pacientes que acudieron con sus parejas a Norba, Ginecología y Reproducción S.L. para someterse a un tratamiento de fertilidad. Tras 20-40 minutos de licuefacción se analizó el volumen, número, movilidad, morfología y el recuento espermático tras capacitación. A continuación, las muestras se agruparon según la actividad física que desarrollaban los pacientes (deportistas habituales, ocasionales o sedentarios) y según su IMC (obesos, pre-obesos y peso normal). Los resultados obtenidos se compararon según diagnóstico con los valores de la OMS 99 y OMS 2010.

RESULTADOS

Al analizar los diferentes parámetros de fertilidad observamos que los varones con hábitos de práctica deportiva presentaban un incremento en el volumen de eyaculado, en la concentración de espermatozoides y en la movilidad espermática respecto a los que tienen una actividad física ocasional o unos hábitos de vida sedentarios. Además, al agrupar los varones en función del IMC se comprobó que el recuento de espermatozoides móviles estaba disminuido en varones preobesos u obesos en grado I. Por otro lado, al agrupar las muestras según diagnóstico utilizando los valores publicados por la OMS en 1999 y en el 2010 observamos que el porcentaje

de normozoospermicos en el grupo de varones con hábitos de vida deportiva fue significativamente superior al resto de los grupos siendo esta diferencia más acusada que cuando se usaron los valores de la OMS 99. Del mismo modo, observamos que el porcentaje de varones con alguna anomalía espermática está incrementado en los preobesos y en los obesos de grado I siendo esta diferencia mayor si empleamos los valores de la OMS 99. Igualmente, llama la atención que con los nuevos valores de referencia desaparecen las teratozoospermias en todos los subgrupos estudiados, mientras que disminuyen los pacientes con oligoastenozoospermia y aumentan los pacientes con oligozoospermia.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo demuestran que la actividad física y el IMC son factores directamente relacionados con la calidad espermática de los varones. Estos resultados se mantienen aunque de forma menos significativa con los nuevos parámetros de la OMS 2010.

Aplicando los valores de referencia publicados por la OMS 2010 aumenta el número de pacientes sin anomalías espermáticas y disminuyen de manera significativa el número de pacientes con teratozoospermia y con oligoastenozoospermia.

082: EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LA HORMONA LUTEINIZANTE (LH) SOBRE LOS CICLOS DE FIV. RESULTADOS SEGÚN LA EDAD

C. Álvarez LLeó, M. Sánchez Toledo, C. García Garrido, S. Navarro Velasco, M. Resta Serra, G. González de Merlo.
Hospital General Universitario de Albacete
e-mail: cristina10lleo@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La LH es la hormona que interviene en la foliculogénesis, esteroidogénesis, maduración ovocitaria, ovulación y mantenimiento del cuerpo lúteo. Sin embargo, se ha cuestionado mucho su papel en los protocolos de hiperestimulación ovárica controlada (HOC). Si bien la suplementación con LH no proporciona beneficios para las pacientes jóvenes normogonadotropas, sí existen indicios de una influencia positiva en pacientes de mayor edad y bajas respondedoras, aunque no está claro su impacto en mujeres menores de 35 años o con riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica.

OBJETIVOS

Analizar el efecto de la administración de LH en los tratamientos de HOC sobre la calidad ovocitaria y los resultados del ciclo de FIV en un grupo de pacientes seleccionadas al azar y en un grupo de pacientes con ≥ 36 años.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se evaluaron prospectivamente 100 pacientes sometidas a FIV con diversos problemas de esterilidad.

1. Estudio 1: 100 pacientes con edad media: $34,0 \pm 4,1$ (21-40 años).
2. Estudio 2: 37 pacientes con edad ≥ 36 años, media $38,9 \pm 1,5$ (36-40 años)

En cada trabajo dividimos las pacientes en dos grupos según las gonadotropinas administradas para la HOC: FSH sola o combinada con LH. Se compararon edad y FSH basal, tratamiento de estimulación, calidad ovocitaria y resultados del ciclo.

La HOC se llevó a cabo utilizando los protocolos de la Unidad de Reproducción del Hospital de Albacete. El control de la respuesta ovárica se realizó mediante control ecográfico y estradiol en sangre.

De los ovocitos MII recuperados se evaluó su calidad morfológica según criterios de ASEBIR valorando:

- Granulosidad citoplasmática (GC).
- Corpúsculo polar (CP):
 - Fragmentado
 - No Fragmentado
- Exudados en el espacio perivitelino (EEPV).

Los MII se microinyectaron. Los embriones obtenidos se clasificaron en D+2/D+3 en tipo A, B, C y D (ASEBIR). La fase lútea se suplementó con progesterona. Cuando la β hCG fue positiva se confirmó la gestación dos semanas después por presencia de saco intrauterino.

RESULTADOS

Estudio 1. Se realizaron dos grupos uno en el que se administró FSH (n=51) y otro FSH+LH (n=49). Se observaron diferencias significativas en edad ($32,6 \pm 4,2$ vs. $35,3 \pm 3,3$ años), FSH basal ($5,7 \pm 1,4$ vs. $7,9 \pm 3,3$ mUI/ml), dosis FSH administrada ($1415,0 \pm 543,7$ vs. $2797,7 \pm 714,3$ UI) siendo mayores en el grupo con LH. Por lo que respecta al resultados del ciclo, el nº folículos ≥ 17 mm ($8,0 \pm 2,4$ vs. $5,7 \pm 2,8$), nº ovocitos recuperados ($12,1 \pm 4,6$ vs. $8,2 \pm 5,0$), nº MII ($9,6 \pm 4,4$ vs. $6,3 \pm 3,9$) y nº fecundados ($5,8 \pm 3,5$ vs. $3,7 \pm 2,5$) fueron significativamente menores. Sin embargo, las tasas de embarazo e implantación fueron similares entre los grupos. Al analizar la calidad de los ovocitos, la GC (p=0,002) y CP fragmentado (p=0,000) fueron

significativamente más frecuentes en los del grupo sin LH y los EEPV (p=0,003) en los del grupo con LH.

Estudio 2. Se realizaron dos grupos uno con FSH (n=24) y otro con FSH+LH (n=13). En las pacientes con LH fue significativamente mayor: la FSH basal ($8,7 \pm 4,3$ vs. $5,0 \pm 1,6$ mUI/ml). Sin embargo, el nº folículos ≥ 17 mm ($5,1 \pm 2,4$ vs. $8,5 \pm 2,3$), nº ovocitos ($6,8 \pm 4,4$ vs. $13,0 \pm 4,7$), nº MII ($5,3 \pm 3,0$ vs. $10,5 \pm 5,0$) y nº fecundados ($3,5 \pm 2,5$ vs. $6,7 \pm 4,3$) fueron significativamente menores. La tasa de embarazo e implantación fueron similares. En cuanto a la calidad de los ovocitos, la GC (p=0,004) y CP fragmentado (p=0,000) fueron significativamente más frecuentes en los del grupo sin LH

CONCLUSIONES

1. La LH siempre se administró a las pacientes con mayor edad y FSH basal.
- El nº total de ovocitos, MII y fecundados fue menor en el grupo con LH.
- Los ovocitos del grupo con LH fueron de mejor calidad.
- La tasa de implantación y embarazo fue similar entre los grupos.
- La LH mejora la calidad de los ovocitos y los resultados del ciclo en pacientes mayores.

083: COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DE TRANSFERENCIAS EN DÍA 4 VS DÍA 5 EN UN PROGRAMA DE DONACIÓN DE OVOCITOS

J. Guerrero, J. Ten, M. Pérez, J. Llácer, R. Bernabeu
 Instituto Bernabeu Alicante
 e-mail: jguerrero@institutobernabeu.com

INTRODUCCIÓN

En la mayoría de laboratorios la transferencia embrionaria se realiza de manera rutinaria coincidiendo con el día 2-3 de cultivo, o en estadio de blastocisto en día 5, mientras que la transferencia en día 4 es una opción que prácticamente no se ha tenido en cuenta. Esto se debe en gran medida a la falta de sistematización de criterios morfológicos que sí están claramente definidos para otros estadios. Hay estudios que sugieren la superioridad de la transferencia de blastocistos respecto a la de embriones en estadio de células debido a una mejor sincronización embrión-endometrio y una selección embrionaria más objetiva una vez se ha producido la activación del genoma embrionario. Sin embargo, no siempre es posible programar la transferencia en día 5, bien por cuestiones relacionadas con el laboratorio o por objeciones de los pacientes. El objetivo de este estudio es evaluar los resultados de la transferencia embrionaria en día 4 en estas situaciones y compararlos con los obtenidos en día 5.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron retrospectivamente 265 transferencias de embriones en fresco en pacientes receptoras de ovocitos, de las que 112 se realizaron en día 4 y 153 en día 5. El día de la transferencia se estableció en función del día de la recogida ovocitaria y de la disponibilidad de los pacientes. Los parámetros clínicos analizados más relevantes fueron la tasa de β -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 una *P* valor < .05.

RESULTADOS

Al evaluar los datos globalmente, se observó un aumento significativo en cuanto a test de embarazo positivo (60,7% vs. 75,2%), embarazo clínico (47,3% vs. 64,1%) y tasa de implantación (34,1% vs. 47,1%) en día 5 comparado con el grupo de día 4. La tasa de aborto clínico fue similar en ambos grupos (11,3% en día 4 vs. 13,4% en

día 5). El número medio de embriones que se lleva a cultivo ($7,1 \pm 2,6$ vs. $8,4 \pm 2,8$) y el número de embriones de buena calidad en día 3 ($3,3 \pm 2,1$ vs. $3,6 \pm 2,1$) fue significativamente mayor en las pacientes transferidos en día 5. Considerando únicamente aquellos ciclos con seis o más embriones evolutivos en día 3 (51 ciclos en el grupo de día 4 y 93 en el grupo de día 5) observamos que estas diferencias desaparecen, obteniendo una tasa de β -hCG positiva del 66,7% vs. 79,3%; embarazo clínico del 54,5% vs. 66,7% y tasa de implantación del 38,2% vs. 48,4% en pacientes transferidos en día 4 y día 5 respectivamente.

CONCLUSIONES

La transferencia de embriones en día 4 ofrece resultados clínicos comparables a los de día 5 cuando el número y calidad de la cohorte embrionaria en día 3 es similar. Por tanto, esta opción permite una mayor flexibilidad a la hora de programar la transferencia embrionaria evitando inconvenientes a los pacientes.

084: ESTUDIO DE LA INTEGRIDAD DEL ADN ESPERMÁTICO EN RELACIÓN CON LA CALIDAD SEMINAL Y LOS RESULTADOS DEL CICLO DE FIV

M. Sánchez Toledo, C. Álvarez Lleó, C. García Garrido, M. Resta Serra, S. Navarro Velasco, G. González de Merlo.
 Hospital General Universitario de Albacete
 e-mail: mariasancheztoledo@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La calidad seminal es un factor determinante del éxito reproductivo. El seminograma es la única herramienta disponible para valorarla pero es subjetivo y limitado a la hora de predecir el resultado de un ciclo de FIV. Además, no proporciona información sobre la

integridad del ADN espermático, básico en la transmisión del genoma paterno al ovocito y factor determinante de la calidad seminal y fertilidad. Este parámetro se está empezando a valorar en la práctica clínica, sin embargo no existe consenso al respecto de su utilidad como predictor del resultado del ciclo.

OBJETIVOS

– Analizar la relación entre la fragmentación del ADN medida mediante SCSA (*Sperm Chromatin Structure Assay*) y la calidad seminal según los parámetros del seminograma.

–Valorar la capacidad predictiva de la fragmentación del ADN sobre el resultado de FIV, así como la relación entre la edad del varón y el grado de fragmentación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se valoraron 43 muestras seminales procedentes de pacientes sometidos a tratamientos de FIV. La edad media de los varones fue $35,62 \pm 4,87$ años y la de las mujeres $33,88 \pm 3,95$ años. Se valoró: volumen, concentración, movilidad progresiva y morfología espermática según criterios de la OMS (2010) El resultado del ciclo se evaluó por su tasa de fecundación, calidad embrionaria el día de la transferencia, β hCG positiva y tasa de gestación clínica (presencia de saco gestacional)

La fragmentación del ADN se valoró utilizando la técnica SCSA. Ésta se basa en el principio de que la cromatina anormal presenta mayor susceptibilidad *in situ* a desnaturalizarse parcialmente. Al teñir las células desnaturalizadas en medio ácido con naranja de acridina, podemos valorar la fluorescencia emitida mediante citometría de flujo y obtener así el porcentaje del índice de fragmentación del ADN (%DFI).

RESULTADOS

Al correlacionar los parámetros del seminograma con el %DFI observamos una correlación negativa entre el %DFI, la movilidad progresiva en fresco ($r = -0,563$, $p = 0,000$); y en capacitado ($r = -0,321$, $p = 0,041$) y la concentración en capacitado ($r = -0,378$, $p = 0,015$) No se observó relación entre fragmentación y tasa de fecundación, calidad embrionaria y tasa de embarazo.

Para estimar como afectaba la edad de ambos miembros de la pareja sobre la tasa de gestación se realizó una regresión logística, no encontrando diferencias. Aunque se observó una tendencia con la edad a disminuir la tasa de embarazo y a aumentar la de aborto, sin embargo esta última no la pudimos comparar estadísticamente debido al pequeño tamaño muestral.

Del mismo modo, estudiamos la posible asociación entre el %DFI y la edad de los varones. Dividimos los pacientes en dos grupos de edad (≤ 36 y > 36 años) Los varones < 36 años presentaban mayor movilidad progresiva en fresco (41,42% vs. 30,47%) ($p = 0,034$) y menor %DFI que los de mayor edad (7,01% vs. 13,2%) ($p = 0,040$) No se observaron diferencias al comparar con los resultados del ciclo de FIV.

Por otra parte dividimos los pacientes en dos grupos según el %DFI ($\leq 10\%$ y $> 10\%$) Los pacientes con fragmentación superior al 10% presentaban mayor edad media (37,95 vs. 34,71 años) ($p = 0,043$) y menor porcentaje de la movilidad progresiva en fresco (24,57% vs. 44,19%) ($p = 0,002$) y de espermatozoides normales (1,92% vs. 3,81%) ($p = 0,016$)

Por último realizamos dos grupos de pacientes: normozoospermicos y con alguna patología seminal. Los normozoospermicos tenían menor edad media (32,33 vs. 36,49 años) ($p = 0,042$) y menor %DFI seminal (4,70% vs. 11,34%) ($p = 0,007$)

CONCLUSIONES

- La movilidad progresiva en fresco desciende con el %DFI.
- La fragmentación del ADN espermático no predice los resultados del ciclo de FIV.
- El incremento de la edad de los varones disminuye la calidad seminal.
- La determinación del %DFI espermático podría ser de utilidad en casos de esterilidad idiopática.

085: INCIDENCIA Y REPERCUSIÓN DE LA APARICIÓN ESPONTÁNEA DE BURBUJAS EN LAS MICROGOTAS DE MEDIO DE CULTIVO TRAS INCUBARLAS EN CONDICIONES DE HIPOXIA Y SIN HUMEDAD

M. Vila, P. Muñoz, E. Ferrer, M. Ferrer, M. Ruiz Jorro
CREA, Centro Médico de Reproducción Asistida, Valencia
e-mail: maria.vila@creavalencia.com

INTRODUCCIÓN

Hemos observado la aparición espontánea de burbujas en las microgotas de medio de cultivo (IVF, G-1 y G-2 – Vitrolife Serie V Plus), utilizando incubadores *bench-top* (K-Systems G-185) en condiciones de hipoxia (5% Oxígeno) y en un ambiente sin humedad.

OBJETIVOS

Intentar saber cuándo y por qué aparecen estas burbujas, su composición y si

existe alguna repercusión en la calidad embrionaria.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizó, de forma prospectiva, la burbuja aparecida en 223 de 1132 gotas de 30 μ l de IVF, en 222 de 1820 gotas de 50 μ l de G-1 y en 165 de 567 gotas de 50 μ l de G-2. Las gotas fueron incubadas entre 16-20 h antes de su uso, en incubadores K-Systems G-185 con baja presión de oxígeno (5% O₂ y 6% CO₂) y sin humedad. El tamaño de la burbuja

se midió utilizando el software Cronus 3 (Research Instruments).

Asimismo, se comparó la calidad embrionaria según la existencia o no de burbuja en la gota: Grupo A, embriones cultivados en gotas sin burbuja (n=52), Grupo B, embriones cultivados con burbuja (n=38) y Grupo C, embriones en gotas de las que se eliminó previamente la burbuja (n=23). Para analizar posibles cambios en la composición del medio, se midió la osmolaridad de la microgota con un

Micro-Osmómetro (Modelo 3300 de Advanced Instruments) y su porcentaje de oxígeno con un microsensar de fibra óptica de 50 micras y un lector Microx TX3 (PreSens). Finalmente, para determinar la composición de la burbuja, se introdujo el microsensar en su interior y se analizó el contenido de oxígeno con el equipo Microx TX3.

RESULTADOS

La formación de burbujas ocurrió en el 19,7% de las gotas de IVF, en un 12,2% de las gotas de G-1 y en un 29,1% de las gotas de G-2, encontrándose diferencias significativas entre todos los medios. El tamaño medio de las burbujas fue similar en todos los medios (IVF: $1,41 \pm 0,37$ mm; G-1: $1,49 \pm 0,47$ mm; G-2: $1,30 \pm 0,44$ mm).

Cuando las burbujas no son eliminadas, alcanzan un tamaño medio, tras 20h más de incubación, similar en todos los

medios ($2,86 \pm 0,96$ mm). Este tamaño no aumenta ya más con el tiempo.

Tampoco se encontraron diferencias en la osmolaridad de los medios cuando se había formado burbuja ($262 \pm 0,06$ mOs) o no en su interior ($265 \pm 0,05$ mOs).

En cuanto a la calidad embrionaria, el porcentaje de embriones A o B (ASEBIR) presente en cada grupo, no presentó diferencias significativas (A: 40,4% ; B: 34,2% ; C: 52,2%).

El porcentaje medio de oxígeno en las gotas de medio de cultivo con o sin burbuja fue similar ($5,3 \pm 0,20\%$ vs $4,9 \pm 0,23\%$), mientras que el porcentaje medio de oxígeno en la burbuja, medido introduciendo en su interior el microsensar de fibra óptica, fue de $21,1 \pm 0,26\%$.

CONCLUSIONES

Las burbujas que aparecen de forma espontánea en las microgotas de cultivo embrionario son burbujas de aire que no afectan a la osmolaridad del medio, al porcentaje de Oxígeno en la gota ni a la calidad de los embriones.

- Su incidencia es diferente según el medio de cultivo, siendo más frecuente su aparición en G-2. El tamaño de la burbuja, sin embargo, es similar en los 3 medios comparados.

- La formación de estas burbujas de aire se podría deber a la acumulación de microgotas de oxígeno provenientes de los medios de cultivo, al ser estos envasados en condiciones atmosféricas (20% de O₂), y a la incapacidad de contener la presión de vapor de agua en el medio líquido por un aumento brusco de la temperatura al preparar las placas.

086: DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL EN PACIENTES PORTADORES DE ANOMALÍAS NUMÉRICAS DE LOS CROMOSOMAS SEXUALES

M. Gaytán, A. Liñán, E. Martínez, M. Ariza, M^aC. Nogales, D. Cernuda, F. Bronet.
IVI Madrid
e-mail: maria.gaytan@ivi.es

INTRODUCCIÓN

El Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es una técnica dirigida a parejas con un mayor riesgo de transmitir a su descendencia alteraciones cromosómicas o genéticas. Este grupo incluye a los pacientes portadores de anomalías numéricas de los cromosomas sexuales: mosaicismos del síndrome de Turner, polisomías del cromosoma X, síndrome de Klinefelter, etc. Las anomalías de los cromosomas sexuales tienen una menor repercusión fenotípica que las de los autosomas, siendo los problemas de infertilidad una de sus consecuencias.

Aunque se espera que estos pacientes generen un mayor número de embriones con aneuploidías para los cromosomas sexuales y para los autosomas, este posible efecto inter cromosómico no ha sido demostrado de forma concluyente. El estudio cromosómico básico en DGP incluye seis autosomas (cromosomas 13, 15, 16, 18, 21 y 22) además de los sexuales (X e Y), y se ha planteado si en este tipo de pacientes sería suficiente con analizar sólo los cromosomas sexuales.

OBJETIVOS

Evaluar si los portadores de anomalías numéricas de los cromosomas sexuales presentan un mayor riesgo de producir embriones aneuploides,

y si estas aneuploidías se limitan a los cromosomas sexuales o también afectan a los autosomas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron 47 embriones mediante FISH procedentes de 12 ciclos de DPI. Al menos uno de los miembros de la pareja era portador de una anomalía numérica de los cromosomas sexuales. La media de edad materna era de 36,7 años.

Para el análisis cromosómico se utilizaron sondas de ADN fluorescentes específicas para la detección de los cromosomas 13, 15, 16, 18, 21, 22, X e Y.

Los resultados obtenidos fueron comparados con valores control. El

análisis estadístico se realizó mediante Chi-cuadrado. Las diferencias se consideraron significativas para $p < 0,05$.

RESULTADOS

Se han evaluado 47 embriones de los cuales 14 eran euploides (29,8%) y 33 aneuploides (70,2%). De estos 33 embriones en un solo caso (3%) las anomalías se limitaban a los cromosomas sexuales, el 36,4% presentaban anomalías tanto de los cromosomas sexuales como de los autosomas y el 60,6% presentaban alteraciones de los autosomas exclusivamente.

Todos los cromosomas analizados presentaban una tasa significativamente mayor de aneuploidías que el grupo control. El cromosoma 13 estaba

afectado en un 25,5% de los embriones (control=6%, $n=200$, $p < 0,0001$), el cromosoma 15 en un 25,5% de los embriones (control=7%, $n=200$, $p=0,0002$), el cromosoma 16 en un 29,8% de los embriones (control 9%, $n=200$, $p=0,0001$), el cromosoma 18 en un 27,7% de los embriones (control 8%, $n=200$, $p=0,0002$), el cromosoma 21 en un 29,8% de los embriones (control 10%, $n=200$, $p=0,0004$), el cromosoma 22 en un 29,8% de los embriones (control 7%, $n=200$, $p < 0,0001$) y los cromosomas sexuales en un 27,7% de los embriones (control 9%, $n=200$, $p=0,0005$).

CONCLUSIONES

La tasa de aneuploidías en embriones que proceden de pacientes portadores de

anomalías numéricas de los cromosomas sexuales es significativamente superior a la tasa de aneuploidías en la población control (70,2% frente a 33%, $n=200$, $p < 0,0001$).

Estas aneuploidías no solo afectan a los cromosomas sexuales, sino que incluso con mayor frecuencia se ven implicados los autosomas. Esto sugiere fuertemente la existencia de un efecto intercromosómico que justifica y hace imprescindible el análisis de los autosomas en los embriones de este grupo de pacientes. Son necesarios estudios con un mayor número de embriones para confirmar esta hipótesis.

087: ESTUDIO DESCRIPTIVO DE MICRODELECCIONES DEL CROMOSOMA Y EN EL HOSPITAL VIRGEN DE LAS NIEVES DURANTE EL PERIODO 2005-2011

B. Pérez, A. Rosales, M. Martínez, I. Delgado, J. Gil, C. Amezcua, S. Pedrinaci.
Servicio Análisis Clínicos. Hospital Universitario Virgen de las Nieves.
e-mail: ana.clavero.sspa@juntadeandalucia.es

INTRODUCCIÓN

Se ha identificado en el cromosoma Y la región susceptible de sufrir deleciones denominadas AZF (factor de azoospermia), que a su vez se dividen en tres regiones: AZFa, AZFb, AZFc, en la que se encuentran genes relacionados con la espermatogénesis. Las microdeleciones del cromosoma Y, tras el síndrome de Klinefelter, constituyen la segunda causa más frecuente de infertilidad masculina, estando presente entre un 2-10% de hombres estériles. Esta incidencia puede aumentar si utilizamos unos criterios más estrictos de selección: oligozoospermia severa y azoospermia no obstructiva. Las microdeleciones más frecuentes son aquellas que afectan a la región AZFc (60%), seguidas AZFb (16%), y raramente afecta a la AZFa (5%). Microdeleciones que afectan a 2 o 3 regiones se diagnostican en un

14% de casos. Con el reciente auge de la reproducción asistida mediante ICSI (microinyección espermática), el estudio de microdeleciones del cromosoma Y ha cobrado especial importancia debido, por un lado a la posibilidad de transmitir esta alteración genética a la descendencia masculina y por otro lado a la relación genotipo/fenotipo, ya que parece ser que deleciones que afectan a la región AZFc son compatibles con la existencia de espermatogénesis residual que podría permitir la recuperación de espermatozoides a partir de biopsia testicular para ser utilizados posteriormente en ICSI. Por todo ello, será necesario dar consejo genético a estas parejas.

El estudio de las microdeleciones del cromosoma Y debe ofrecerse a pacientes que presenten azoospermia o concentraciones menores 1×10^6

espermatozoides/mL. En general este estudio está indicado a pacientes que presentan anomalías cromosómicas, azoospermia obstructiva, hipogonadismo hipogonadotrófico y patologías como varicocele, criptorquidia, infecciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron un total de 460 muestras desde marzo de 2005 hasta marzo de 2011. A partir de ADN de sangre periférica se realizó una amplificación mediante 2 PCRs multiplex, usando siete marcadores microsatélites para analizar las 3 regiones AZF del cromosoma Y: sY86 (región AZFa), sY127, sY134 (región AZFb), sY254, sY255 (región AZFc, gen DAZ). Como control interno se incluyeron los genes SRY y ZFY, analizándose los productos de PCR mediante electroforesis capilar.

RESULTADOS

Desde marzo de 2005 hasta marzo del presente año, se han analizado un total de 468 muestras procedentes de varones con problemas de esterilidad. Del total analizado, en 455 casos (96,3%) se descartó la existencia de microdeleciones en Y; y en 13 casos (3,7%) se diagnosticó la presencia de microdeleciones en el cromosoma Y. De los pacientes afectados, 9 casos (69,2%) presentaron deleción de la región AZFc completa, 2 casos (15,4%) presentaron deleciones en las regiones AZFb + AZFc, 1 caso (7,7%) la deleción afectada

fue la AZFb, y 1 caso (7,7%) presentó microdeleción de las regiones AZFa + AZFb + AZFc.

CONCLUSIONES

El estudio de las microdeleciones del cromosoma Y es una técnica simple, económica y no invasiva, que nos permite el diagnóstico genético de algunos casos de la esterilidad masculina.

Debido al reciente auge de la reproducción asistida mediante ICSI, el diagnóstico de las microdeleciones

del cromosoma Y es muy importante, tanto por su capacidad de predecir la posible existencia de espermatogénesis residual, como por la necesidad de dar consejo genético ante la posible transmisión de la deleción a la descendencia masculina.

La incidencia de microdeleciones en varones con problemas de esterilidad en nuestro medio es de un 3,5% concordando con la encontrada en la literatura.

088: POSICIÓN DEL ESPERMATOZOIDE EN LA MICROINYECCIÓN Y SU INFLUENCIA EN LA FECUNDACIÓN

A. Sáez, C. Muñoz, C. Olmedo, J. L. Soriano, I. Cuevas
Hospital General Universitario de Valencia
e-mail: alsaecue@etsia.upv.es

INTRODUCCIÓN

Desde el nacimiento en 1992 del primer niño mediante microinyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI), esta técnica se ha convertido en una de las más relevantes dentro de la medicina reproductiva. El proceso de microinyección es un paso extremadamente importante para la correcta fecundación. Sin embargo, técnicamente resulta complicado inyectar el espermatozoide en la posición deseada debido a que este procedimiento se ve influenciado por la calibración del microinyector así como por las condiciones del citoplasma ovocitario, entre otros.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio es establecer la posible relación entre el lugar de la deposición del espermatozoide en el citoplasma ovocitario durante la microinyección y la tasa de fecundación observada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recopilieron los datos de un total de 495 ovocitos microinyectados consecutivamente de 72 pacientes

sometidas a tratamientos de fecundación in vitro (ICSI) en la Unidad de Reproducción Humana Asistida del Hospital General Universitario, desde el período comprendido entre abril de 2009 y febrero de 2010.

Durante el procedimiento de microinyección se fue anotando la posición en la que se depositaba el espermatozoide y posteriormente se observó qué ovocitos habían fecundado. Para poder establecer una relación se dividió el citoplasma ovocitario en 4 zonas equivalentes: siendo la zona 1 la más cercana a la pipeta de Holding y la 4 la más alejada.

Los datos obtenidos se analizaron mediante el test chi-cuadrado usando el programa estadístico SPSS 11.0. Dado que los datos analizados se obtuvieron de forma consecutiva, se realizó aleatorización para evitar sesgos en los 495 ovocitos.

RESULTADOS

La muestra obtenida en la aleatorización fue de 244 ovocitos. El 4,2% de los espermatozoides microinyectados quedaron depositados en la zona 1. El 67,6% en la zona 2, el 21,8% en la zona 3

y el 6,3% en la zona 4. Se analizó la tasa de fecundación de los diferentes lugares de deposición del espermatozoide por separado, siendo del 2,2% en zona 1, 69,8% en zona 2, 24,5% en zona 3 y 3,6% en zona 4, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas. La chi-cuadrado obtenida fue de 0.037.

CONCLUSIONES

Las mayores tasas de fecundación se obtienen cuando los espermatozoides se depositan en la zona 2 y las peores tasas en las zonas 1 y 4. La zona 3 tiene una tasa de fecundación intermedia, quizá debido al posterior arrastre del espermatozoide por la membrana ovocitaria a la zona descrita como 4. El estudio sugiere que la composición del citoplasma ovocitario a nivel periférico y a nivel central es tan diferente que puede estar afectando a la fecundación.

089: APLICACIÓN DE LA SELECCIÓN ESPERMÁTICA MEDIANTE IMSI EN PAREJAS CON TERATOZOOSPERMIA. RESULTADOS PRELIMINARES

C. Puche¹, J.C. Capdevila¹, S. Rovira¹, C. Castelló¹, J. Massó¹, M. Solans¹, M. López-Teijón^{1,2}, E. Velilla¹
 Institut Marquès¹, Barcelona; Fundació Leonardo Marquès², Barcelona
 e-mail: silvia.fernandez@institutomarques.com

INTRODUCCIÓN

La microinyección intracitoplasmática de espermatozoides seleccionados morfológicamente mediante alta magnificación (IMSI) nos permite visualizar los espermatozoides morfológicamente normales según criterios de la OMS con ausencia o presencia de una mínima cantidad de vacuolas. Diferentes publicaciones han demostrado, tras la observación a alta magnificación, una correlación entre una morfología normal de la cabeza del espermatozoide y mayores tasas de embarazo, así como menores tasas de aborto, tanto en pacientes con fallos repetidos de implantación (Bartoov *et al.*, 2002, 2003; Junca *et al.*, 2004; Berkovitz *et al.*, 2005; 2006) como en pacientes con altos niveles de fragmentación del DNA (Hazout *et al.*, 2006). La utilización de dicha técnica para seleccionar en mayor medida los espermatozoides morfológicamente normales de una muestra seminal con elevado porcentaje de formas alteradas (teratozoospermia) diagnosticada mediante microscopía de baja resolución, podría mejorar el pronóstico

clínico de este grupo de pacientes. A pesar de esto, no existe un consenso claro en cuanto a las indicaciones clínicas donde la aplicación de esta técnica presenta un beneficio.

OBJETIVOS

El objetivo de este estudio es valorar la aplicación de la tecnología IMSI como tratamiento en parejas con alteraciones en la morfología espermática.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se incluyen un total de 70 ciclos de esterilidad de larga evolución que presentan <4% de formas normales en la muestra seminal (Kruger *et al.* 1988). GI: ICSI (n=35) y GII: IMSI-ICSI (n=35). Se descartan del estudio aquellos ciclos con meiosis, fragmentación del DNA y FISH alterados. Se seleccionan mediante IMSI únicamente los espermatozoides normales sin vacuolas o bien aquellos que presentan como máximo dos vacuolas pequeñas que ocupan menos del 4% de la cabeza. Se microinyectan un total de 576 ovocitos, 283 correspondientes al GI y 293 al

GII. Se analiza la tasa de fecundación, de embriones evolutivos, de embarazo y de embarazo evolutivo. La media de embriones transferidos fue de 2,2. El análisis estadístico se realiza mediante *two-tailed test Chi-cuadrado* (95% IC).

RESULTADOS

No se detectan diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros analizados: tasa de fecundación (71.7%-GI vs 71.4%-GII), de embriones evolutivos (58.7 % -GI vs 44.5% -GII), de embarazo/transfer (34.3%-GI vs 44.5%-GII) y de embarazo evolutivo/transfer (22.8%-GI vs 37.1%-GII).

CONCLUSIONES

Los resultados muestran una mayor tasa de embarazo evolutivo utilizando la técnica de IMSI en pacientes que presentan teratozoospermia, aún así los resultados no son estadísticamente significativos. Consideramos que es necesario aumentar el número de casos para confirmar estos resultados.

090: ¿EN QUÉ ESTADIO EMBRIONARIO ES MEJOR TRANSFERIR Y CONGELAR? EVALUACIÓN GENERAL DE LOS CICLOS DE FIV

M. A. Carracedo, J. Ten, J. Guerrero, J. Llácer, R. Bernabeu
 Instituto Bernabeu
 e-mail: jten@institutobernabeu.com

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, en los tratamientos de fecundación in Vitro (FIV) no es extraordinario encontrarnos el día de la transferencia embrionaria con un elevado número de embriones de buena calidad. Para la transferencia

en fresco serán elegidos los embriones que morfológica y cinéticamente presenten mejor desarrollo y 'los restantes' de buena calidad podrán ser criopreservados para que la pareja los utilice en un futuro, bien para tener un nuevo hijo o bien en el caso de que la transferencia de embriones frescos

no haya dado lugar a una gestación evolutiva. Con las nuevas técnicas de criopreservación que tenemos hoy día (vitrificación) las tasas de gestación son casi comparables a las obtenidas con embriones en fresco por lo que a la hora de evaluar los resultados de los ciclos de FIV debemos considerar tanto las

transferencias de embriones en fresco como con embriones criopreservados. Pero ¿en qué estadio embrionario es mejor transferir y congelar?

Teóricamente, con la transferencia de blastocistos se obtendrían mejores tasas de implantación, mejor selección embrionaria, el número de embriones a transferir se reduciría y habría una mejor sincronización entre el embrión y el endometrio. Sin embargo, el riesgo de cancelación del ciclo por no transferencia es mayor y 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.

OBJETIVO

Determinar qué día es el más apropiado para la transferencia y congelación embrionaria: estadio de células (día 3) o estadio de blastocisto (día 5).

MATERIAL Y MÉTODOS

Análisis prospectivo randomizado de 55 ciclos de FIV/ICSI con transferencia de dos embriones, realizados desde junio de 2009 hasta la actualidad en nuestro centro. Se establecen dos grupos de estudio: grupo A (n=27): ciclos transferidos en día 3 con al menos 1 embrión categoría A y 2 embriones categoría B (criterios ASEBIR) en el día de la transferencia, y grupo B (n=28): ciclos transferidos en día 5 con al menos 1 embrión categoría A y 2 embriones categoría B en día 3. Las variables analizadas son: edad materna, tasas de fecundación, embarazo clínico e implantación, % de ciclos con embriones criopreservados y % de embriones criopreservados y tasa de embarazo clínico acumulada (ciclo en fresco más ciclo criopreservado).

RESULTADOS

Para las variables edad materna (33.07 vs. 33.43), tasa de fecundación (73.01 vs. 75.51), tasa de embarazo clínico (51.90 vs. 53.60), tasa de implantación

(38.89 vs. 39.29) y tasa de embarazo clínico acumulada (88.90 vs. 71.40) no existen diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$). Para las variables % de ciclos con embriones criopreservados (96.30 vs. 71.40) y % de embriones criopreservados (57.41 vs. 30.95) sí que existen diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) a favor del día 3.

CONCLUSIONES

Según el diseño de nuestro estudio se observa una tendencia a obtener mejores resultados con la transferencia y congelación embrionaria en día 3. Hay más pacientes que congelan embriones, el número de embriones para congelar es mayor y cuando se evalúa globalmente el ciclo (tasas acumuladas) los resultados son mejores. Seguimos incluyendo pacientes en el estudio para ampliar el número de casos y reevaluar estos resultados.

091: VALIDEZ DE LA MAGNIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA PREVIA A IMSI

R. Lafuente, G. López, J. Canals, D. Rey, E. Carballo y M. Brassesco
CIRH-Clinica Corachan. Barcelona
e-mail: rlafuente@cirh.es

INTRODUCCIÓN

Para poder realizar un buen diagnóstico clínico en el varón es necesario disponer de técnicas que nos permitan valorar la viabilidad de los espermatozoides desde distintos puntos de vista. Recientemente, han aparecido distintas metodologías en este sentido como el estudio de la fragmentación del ADN, el estudio de la madurez espermática mediante la unión al ácido hialurónico, y también la alta magnificación de espermatozoides. Todas estas técnicas valoran cosas diferentes y resulta de máximo interés poder evaluar su utilidad y compararlas entre sí.

La alta magnificación de espermatozoides o la fragmentación del ADN son predictores del fracaso del

ciclo de fecundación *in vitro* (FIV). Está demostrado por otros autores el efecto negativo que tiene la vacuolización espermática y la fragmentación del ADN sobre la calidad embrionaria y la tasa de embriones no evolutivos. Sin embargo, se necesitan más estudios que correlacionen estas técnicas y su importancia en tratamientos de IMSI.

OBJETIVOS

Se trata de valorar la utilidad del estudio de la magnificación espermática a 8000x en pacientes que se van a someter a un tratamiento de FIV, como método diagnóstico y como prueba de viabilidad previa a una posible IMSI. Nos interesa además, correlacionar la información obtenida con otros parámetros como la concentración espermática, la

movilidad o la fragmentación del ADN espermático.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron 270 parejas estériles de forma aleatoria, que acuden a realizarse un tratamiento de FIV a nuestro centro desde finales de 2009.

A todos los pacientes se les realiza un estudio seminológico completo, siguiendo las recomendaciones de la OMS, y una determinación morfológica de alta magnificación con un microscopio invertido LeicaAM6000, clasificando a los espermatozoides en cuatro grados según la presencia vacuolar. El análisis de la fragmentación del ADN se realizó mediante la técnica SCD (Halosperm, Halotech DNA, SL),

según protocolo del fabricante. Se considera una fragmentación alterada a partir del 30% (Fernández JL, *et al.*, 2003).

Se analiza la tendencia que muestran los resultados al comparar la magnificación con la concentración, la movilidad y la fragmentación del ADN.

RESULTADOS

Se observa una tendencia positiva cuando se comparan los espermatozoides menos vacuolados con la concentración espermática.

De la misma manera, al considerar la movilidad, la tendencia es positiva, es decir, los pacientes con espermatozoides menos vacuolados presentan mejor movilidad.

En cuanto a la fragmentación, también resulta interesante observar que a medida que aumentan los valores de fragmentación, también aumenta el índice de vacuolización.

CONCLUSIONES

La magnificación espermática se puede definir como una nueva prueba

diagnóstica en la que es necesario mayor consenso a la hora de establecer criterios de clasificación según grado de vacuolización y el límite de normalidad estándar, pero que ofrece información valiosa de cara a poder orientar el tipo de tratamiento reproductivo aconsejado a los pacientes.

Da una información precisa de las posibilidades de realizar una IMSI, al poder evaluar previamente el grado de vacuolización, y resulta evidente cómo la magnificación se correlaciona con los parámetros básicos del seminograma y con la fragmentación del ADN.

092: INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO DEL SEMEN CON QUIMIOTRIPSINA EN CICLOS FIV/ICSI

A. Ortiz, F. Monllor, G. Lozano, B. Vicente, A. Pérez, M. Jiménez

Centro Extremeño de Reproducción Humana Asistida. Hospital Materno e Infantil de Badajoz

e-mail: fabianmonllor@hotmail.comte@cirh.es

INTRODUCCIÓN

Tras la eyaculación, se activan en el semen mecanismos dependientes de factores que se originan en la glándula de Cowper y en la próstata, que favorecen la licuefacción del mismo.

Inmediatamente después de la eyaculación en el vaso de recolección, el semen es típicamente una masa coagulada semisólida. Normalmente la muestra licua completamente con 15 min a temperatura ambiente, siendo raro que tarde 60 min o más.

En ocasiones las muestras pueden no licuar, dificultando la evaluación del semen. En estos casos puede ser necesario un tratamiento adicional como la digestión enzimática utilizando enzimas proteolíticas como la quimiotripsina (QT).

Este tratamiento es utilizado en muestras de semen en las que pasados 30-60 min a 37°C no han licuado completamente. Sin embargo, podría afectar bioquímicamente al plasma seminal y a la motilidad y viabilidad de los espermatozoides debido a que podría alterar la actividad de la enzima α -glucosidasa, presente en el semen y

responsable de la movilidad y adhesión del espermatozoide a la zona pelúcida.

OBJETIVO

Nos planteamos analizar la repercusión del tratamiento del semen con QT sobre el REM (recuperación de espermatozoides móviles), el % de fecundación correcta (%2PN), el % de embriones de categoría A+B según la clasificación ASEBIR y la gestación en dos ciclos FIV/ICSI distintos de una misma pareja en los que, en uno de ellos fue necesario el tratamiento con QT y en el otro no.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 110 muestras de semen obtenidas de 55 pacientes sometidos a ciclos FIV/ICSI en dos ocasiones cada uno, siendo necesario el uso de QT en uno solo de los ciclos.

Las muestras de semen no licuadas tras la recolección se sometieron a un tratamiento de 3 min con QT utilizando un vaso Marq-10. Las muestras se capacitaron mediante técnica de *swim-up* y se utilizaron posteriormente para fecundar los ovocitos mediante inyección intracitoplasmática (ICSI) y/o fecundación in vitro (FIV) convencional.

En cada par de muestras se analizaron los siguientes parámetros: REM, %2PN, %A+B y test de gestación.

La relación entre el uso de QT y el test de gestación se analizó mediante tabla de contingencia. Los otros tres parámetros se analizaron mediante el estadístico t de Student para muestras relacionadas. En todas las comparaciones se calculó el P valor, considerando una diferencia significativa cuando $P < 0,05$. En la tabla de contingencia se calculó también el Coeficiente de contingencia (C) que puede oscilar entre 0 (correlación nula) y 0,81 (correlación máxima). Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa SPSS Statistics 17.0.

RESULTADOS

De cada pareja de parámetros se obtuvieron los siguientes valores de P:

- 1ª.- REM sin QT-REM con QT: $P=0.327$
- 2ª.- %2PN sin QT-%2PN con QT: $P=0.447$
- 3ª.- %A+B sin QT-%A+B con QT: $P=0.986$

No se encontraron por lo tanto diferencias significativas en ninguno de los tres pares analizados.

De la comparación entre el resultado del test de gestación y el uso de QT se obtuvo un valor de $P=1$ y un Coeficiente de contingencia de $C=0$. Por lo tanto la diferencia en absoluto es significativa y la correlación entre ambas variables es nula.

CONCLUSIONES

Dado que no observamos diferencias significativas ni correlación entre el uso o no de QT con respecto al REM, el %2PN, el %A+B y el resultado del test de gestación en los casos analizados,

concluimos que el empleo de QT para conseguir la completa licuefacción de las muestras de semen empleadas en los ciclos FIV/ICSI es una herramienta útil para agilizar el tratamiento de las muestras previo a la técnica.

093: VARIABLES MORFOLÓGICAS Y MORFOMÉTRICAS PREDICTORAS DE GESTACIÓN EN UN PROGRAMA DE FIV-ICSI

E. Lázaro, I. Molina, J. Pertusa, A. Debón, P.J. Fernández, A. Pellicer.

Unidad de Reproducción Humana Asistida. Hospital Universitario La Fe, Valencia

e-mail: ellzaib@etsia.upv.es

INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas más importantes de las Técnicas de Reproducción Asistida son las gestaciones múltiples que suponen un riesgo importante para la salud materno-fetal. Estos riesgos solo los podemos eliminar disminuyendo el número de embriones a transferir. Para disminuir el número de embriones transferidos sin disminuir las tasas de gestación y de implantación es imprescindible mejorar las técnicas actuales de selección embrionaria desarrollando nuevas herramientas que permitan seleccionar a los embriones con un mayor potencial de implantación.

OBJETIVOS

En el presente trabajo, se pretende validar la capacidad predictiva de diversos parámetros morfológicos y morfométricos a partir del análisis de imágenes de embriones que ya han sido transferidos y de los cuales se conoce su destino. La incorporación de estas variables morfométricas a los sistemas de clasificación embrionaria actuales permitirá mejorar y facilitar considerablemente la selección embrionaria previa a la transferencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron fotografías de 217 embriones procedentes de 112 ciclos de FIV-ICSI realizadas inmediatamente antes de su transferencia. Se transfirieron 1, 2 ó 3 embriones en día 2 de desarrollo. Los embriones procedían de 56 ciclos realizados entre Diciembre

de 2009 y Marzo de 2010 que dieron lugar a gestación, y de 56 ciclos seleccionados al azar durante el mismo periodo de tiempo que no dieron lugar a gestación.

Se evaluaron variables clínicas de la pareja (edad de la mujer, factor varón severo, transferencia selectiva y número de embriones transferidos y congelados); variables embrionarias morfológicas (número de células, simetría y fragmentación de las blastómeras y anomalías estructurales de la zona pelúcida) y las variables embrionarias morfométricas (área y perímetro, radio del círculo equivalente y factor de circularidad del embrión y de cada una de sus blastómeras y espesor de la zona pelúcida).

Se compararon las variables clínicas de la pareja y las variables embrionarias (morfológicas y morfométricas) en función de la gestación.

RESULTADOS

No se observaron diferencias significativas para las variables clínicas de la pareja en función de la gestación. Ambos grupos son homogéneos y las diferencias que se puedan encontrar parecen debidas a las características propias de los distintos embriones y no a efectos derivados de los ciclos de FIV-ICSI de los que proceden. La capacidad discriminante de las variables morfométricas fue muy superior a la de las variables morfológicas. Todo ello permite plantear el siguiente perfil para los embriones con mayor capacidad para gestar: embriones de 4 células en

día 2 de desarrollo, con un porcentaje de fragmentación menor del 35%, sin alteraciones estructurales en la zona pelúcida, con una media para el perímetro del embrión de 211 micras, con todas las blastómeras con apariencia esférica (factor de circularidad 0,91), con una media para el área del blastómero de 3270 micras², con una media para el radio del blastómero de 32 micras y con un espesor de la zona pelúcida de 14 micras aproximadamente.

CONCLUSIONES

Las variables morfométricas permiten disminuir la subjetividad de los sistemas de clasificación embrionarios actuales, presentando una mayor capacidad discriminante y predictora de gestación.

La variable factor de circularidad de las blastómeras podría sustituir a las variables simetría e igualdad de las blastómeras. La dimensión del embrión y de sus células, descrito con las variables: radio del círculo equivalente y sus parámetros derivados, es un factor objetivo a tener en cuenta en la predicción de la gestación.

Proponemos un nuevo sistema de clasificación basado en las variables morfológicas: número de células y porcentaje de fragmentación y en las variables morfométricas: factor de circularidad y radio del círculo equivalente del embrión y las blastómeras, y espesor de la zona pelúcida. Este nuevo sistema mejoraría y facilitaría la selección de los embriones previa a la transferencia.

094: CONTROL DE LAS CONDICIONES MICROAMBIENTALES EN INCUBADORES K-SYSTEMS G-185 SIN HUMEDAD Y COMPARACIÓN CON INCUBADORES CONVENCIONALES

M. Vila, E. Ferrer, P. Muñoz, M. Ferrer, M. Ruiz Jorro
CREA, Centro Médico de Reproducción Asistida, Valencia
e-mail: maria.vila@creavalencia.com

INTRODUCCIÓN

La introducción de incubadores *bench-top* en los laboratorios de embriología, obliga a una readaptación en determinados procedimientos. En nuestro caso, tras la adquisición de incubadores K-Systems G-185 funcionando en condiciones de cultivo con hipoxia controlada y sin humedad, nos planteamos realizar un estudio comparativo de las condiciones microambientales, respecto a un incubador convencional.

OBJETIVOS

Análisis de Temperatura y Osmolaridad en la cámara y en la gota de medio de cultivo de un incubador K-Systems G-185 y comparación con un incubador convencional (Heracell-150).

Valoración de la posibilidad de utilizar la cámara grande del G-185 con una entrada de gas y un sistema externo de humidificación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Monitorización durante 72h de temperatura y humedad en el interior de los incubadores (Heracell-150 y K-Systems G-185) así como temperatura de las microgotas de medio de cultivo, mediante sondas termopar de tipo K 0,1 mm con calibración ENAC. Monitorización de temperatura de la base calefactada del G-185 con idéntica metodología. Medición de osmolaridad sobre gotas de 40µl y

placas de cuatro pocillos con 500µl de medio G-1 (Vitrolife) a las 24h, 48h y 72h de equilibrado con Micro-Osmómetro (modelo 3300 de Advanced Instruments).

Las condiciones generales del laboratorio (temperatura, humedad, presión positiva, renovaciones, etc.) estuvieron siempre controladas.

RESULTADOS

La cámara de cultivo del G-185 está más fría que la del Heracell-150 ($34,88 \pm 0,14$ °C y $34,99 \pm 0,12$ °C vs $37,25 \pm 0,05$ °C y $36,95 \pm 0,06$ °C) pero la temperatura de la microgota, medida por duplicado, permanece igual de estable ($36,71 \pm 0,09$ °C y $36,82 \pm 0,06$ °C vs $37,26 \pm 0,05$ °C y $36,38 \pm 0,08$ °C) en ambos incubadores, debido a la estabilidad de la temperatura de la base calefactada del G-185 ($37,83 \pm 0,05$ °C y $37,64 \pm 0,03$ °C).

La humedad en el Heracell-150 fue de $96,4 \pm 0,06\%$ mientras que en la cámara grande adaptada del G-185 fue de solo un $75,3 \pm 0,09\%$.

La osmolaridad de las microgotas de medio de cultivo G-1 cubiertas con aceite y preequilibradas durante 24h, 48 y 72h fue de 261,263 y 266 mOs en el Heracell-150 y de 263, 269, 266 mOs en el G-185.

Se observa un importante aumento de la osmolaridad al incubar 500uL de medio IVF sin cubrir de aceite en placa de cuatro pocillos en las cámaras

normales de cultivo del G-185 respecto al Heracell1-150 (286, 389 y 541 mOs a las 24h, 48h y 72h, frente a 271, 266 y 273 mOs en el Heracell1-150).

Cuando acoplamos un sistema externo de humidificación a la cámara grande del G-185 y medimos la osmolaridad de 1ml, 1,5 ml y 2ml de medio equilibrado en un tubo Falcon 2003 obtenemos unos valores de 291, 271 y 259 mOs.

CONCLUSIONES

- Las condiciones de temperatura y osmolaridad en un incubador G-185 son muy estables.
- La temperatura en las microgotas de cultivo no se ve afectada por la entrada, en la cámara de cultivo, del gas, a menor temperatura.
- Trabajando bajo aceite mineral, la osmolaridad de las gotas de cultivo es la misma con una atmósfera humidificada o sin humidificar.
- No es posible trabajar con placas de cuatro pocillos sin aceite mineral en el G-185.
- La humedad máxima alcanzada en la cámara grande del G-185 acoplado una entrada externa de gas prehumidificado y atemperado, es insuficiente para trabajar con volúmenes inferiores a 2 ml de medio de cultivo sin aceite.

095: COMPARATIVA DE RESULTADOS DE DESCONGELACIÓN LENTA VS DESVITRIFICACIÓN

L. Andrés Criado, M. Sánchez de Burgos, M. Morales Morales, M. Cuadros, J.L. Gómez Palomares, E. Hernández, J. Cuadros
Clínica de Medicina de la Reproducción y Ginecología FIVMadrid
e-mail: jcuadros@fivmadrid.es

INTRODUCCIÓN

La vitrificación de embriones es una técnica relativamente nueva que se va incorporando como técnica de rutina en los centros de reproducción asistida. Desde mediados del año 2008 hemos ido implantando progresivamente dicha técnica en nuestro centro.

OBJETIVO

Considerando que hemos completado la curva de aprendizaje, nos interesa comparar los resultados obtenidos con desvitrificación versus los que tenemos con la descongelación lenta tradicional, tanto en tasas de embarazo como en tasas de aborto.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo y randomizado desde Enero de 2010 hasta Febrero de 2011. La técnica de congelación en cada paciente se decidió mediante el programa estadístico Research Randomizer Form v4.0.

Se llevaron a cabo un total de 133 descongelaciones lentas vs 105 desvitrificaciones.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos los presentamos en la siguiente tabla:

CONCLUSIÓN

El análisis estadístico mediante el test de Chi-cuadrado no mostró diferencias significativas en los resultados obtenidos con ambas técnicas, si bien la tasa de aborto es considerablemente más alta en los ciclos de desvitrificación de embriones.

	Nº de ciclos	hCG +	Gest. clínica	Aborto	Emb. evolutivo
Descongelación lenta	133	33,1% (44/133)	27,1% (36/133)	16,6% (6/36)	22,5% (30/133)
Desvitrificación	105	37,1% (39/105)	33,3% (35/105)	34,3% (12/35)	21,9% (23/105)

096: BENEFICIO DE LA TÉCNICA DE ECLOSIÓN ASISTIDA EN GRUPOS SELECCIONADOS DE PACIENTES INFÉRTILES

P. Torres, C. Ribes, I. Peinado, M. De la Orden, P. J. Fernández, V. Montañana, JM. Rubio y A. Pellicer
Servicio Ginecología (Reproducción Asistida), Hospital Universitario La Fe, Valencia.
e-mail: patriblanc81@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

El fallo de implantación podría deberse a la imposibilidad del blastocisto de escapar de su zona pelúcida (ZP). La edad avanzada materna conlleva cambios en la arquitectura de la ZP los cuales también dificultarían la eclosión.

OBJETIVO

Evaluar la eficacia de la técnica de Eclosión Asistida (EA) en pacientes con fallo de implantación recurrente

(mínimo 2 transferencias con embriones en fresco sin gestación) y edad materna avanzada (mayor de 36 años, sin gestaciones previas).

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio prospectivo que incluyó 181 ciclos consecutivos de pacientes cuyos criterios de inclusión fueron: función reproductora normal, más de 36 años y/o tercer ciclo FIV/ICSI en el Hospital Universitario La Fe de Valencia en los años 2009 y 2010. Las pacientes se

repartieron aleatoriamente en grupo de estudio (realizándose EA=52) y control (NoEA=129). Los parámetros estudiados fueron: características físicas de la pareja, parámetros básicos de estimulación, calidad embrionaria y resultados de los ciclos (tasa de gestación (TG), tasa de implantación (TI), tasa de aborto (TA) y tasa de niño en casa (TNC)). Los parámetros morfológicos se analizaron mediante el programa de análisis de imagen CRONUS®. El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS

18.0. Los parámetros cuantitativos fueron comparados usando el test -T o U de Mann Whitney; para los parámetros cuantitativos χ^2 o Fisher, utilizándose un nivel de α igual a 0,05.

RESULTADOS

El estudio estadístico de los datos mostró homogeneidad de los grupos con respecto a todos los parámetros evaluados en la población estudiada y tras seleccionar los pacientes por: fallo de implantación o edad avanzada.

En la población estudiada no se observó diferencias significativas entre los grupos evaluados en relación a: TG (EA 30,8% (16/52) vs NoEA 29,5% (38/129); p-valor = 0,861); TI (EA 16,8% (18/107) vs NoEA 18% (49/272); p-valor = 0,460); TA (EA 33,3% (3/9) vs NoEA 25,9% (7/27); p-valor = 0,667) y

TNC (16,3% EA (8/49) vs NoEA 19,4% (24/124); p-valor = 0,644).

1.- Fallo implantación: EA (n=36) y NoEA (n=95). La realización de la técnica de Eclosión tampoco mostró diferencias significativas: la TG (EA 30,6% (11/36) vs NoEA 28,4% (27/95), p-valor=0,810); TI (EA 14,7% (11/75) vs NoEA 15,8% (32/203); p-valor=0,705); TA (EA 44,4% (4/9) vs NoEA 28,6% (7/26), p-valor=0,416) y TNC (EA 14,7% (5/34) vs NoEA 19,1% (18/94); p-valor = 0,563).

2.- Edad avanzada: EA (n=30) y NoEA (n=60). La realización de la técnica de Eclosión o no en esta selección de pacientes, tampoco mostró diferencias significativas: la TG (EA 28,0% (7/25) vs NoEA 17,8% (8/45), p-valor=0,318); TI (EA 15,1% (8/53) vs NoEA 10,5% (10/95); p-valor=0,523); TA (EA 75% (3/4) vs

NoEA 16,7% (1/6), p-valor=0,190) y TNC (EA 4,5% (1/22) vs NoEA 11,6% (5/43); p-valor = 0,655).

CONCLUSIÓN

Nuestros datos muestran TG similares tanto en la población estudiada como tras seleccionar pacientes con fallos de implantación previos, demostrando que el fallo repetido de implantación no es una indicación para la realización de la técnica de Eclosión Asistida. No obstante, la tasa de gestación e implantación tras EA parece ser más alta, sin llegar a ser significativa, en pacientes con edad avanzada. Futuras investigaciones podrían ayudar a evaluar la eficacia de la EA en este grupo de mujeres con mayor riesgo de endurecimiento en la ZP.

097: PROTOCOLO CORTO DE ANÁLISIS DE MUTACIONES PUNTUALES EN EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL DEL SÍNDROME DE DEPLECIÓN DEL ADN MITOCONDRIAL DE TIPO POLG1

Á. Gómez Duro¹, M. Martínez-Fresno¹, P. Eibes Peteiro¹, A. Sotillo, J. Muñoz², C. Zonza², E. Fernández¹

¹Geniality Diagnóstico Genético, Madrid, ²Instituto Madrileño de Fertilidad, Madrid

e-mail: agomez@geniality.es

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades mitocondriales son un grupo heterogéneo de trastornos, secundarios a un defecto en el metabolismo energético debido a una disfunción del sistema de fosforilación oxidativa. La mayoría de las enfermedades que se inician en la edad pediátrica se deben a mutaciones en genes nucleares y son de herencia recesiva. Presentamos el caso de una pareja que consulta porque han tenido una niña, fallecida antes del año de edad por enfermedad neurodegenerativa de evolución rápida, diagnosticada de un síndrome de depleción del ADN mitocondrial de tipo autosómico recesivo y cuyo estudio genético revelaba la presencia de dos mutaciones puntuales en heterocigosis en el gen POLG1 (15q25).

Este tipo de estudios de informatividad se realizan analizando marcadores tipo *short tandem repeat* (STRs), colindantes a la mutación para establecer la segregación, identificando los cromosomas portadores de los padres y el estudio mediante minisequenciación de las mutaciones implicadas. Para mejorar el rendimiento de la minisequenciación en una sola célula, se realizan de forma rutinaria dos rondas de amplificación (*nested-PCR*) (Figura 1). Para completar este proceso se requiere un total de 7 horas.

OBJETIVO

Desarrollar un protocolo de minisequenciación mediante gradiente de concentración de *primers* en una sola ronda de amplificación, que permita acortar el protocolo de estudio de mutaciones puntuales en una sola

célula, en este caso, aplicado al estudio de mutaciones en el gen POLG1 en Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron las muestras de ADN provenientes de la pareja, la niña fallecida, así como los padres de ella y la madre de él, con el fin de establecer la segregación del cromosoma 15 y poder detectar posibles recombinaciones que pudieran haber ocurrido en la niña.

Se realiza el estudio de informatividad, mediante PCR multiplex, para identificar los marcadores STR informativos y semi-informativos para el DGP (D15S1046, D15S979, D15S202, D15S116, D15S127). Se diseñaron *primers* para el estudio por minisequenciación (**SNaPshot**[®], Applied Biosystems) de las mutaciones

en POLG1: C752T (p.T251I) en el EXON 3 y G2584A (p.A862T) en el EXON 16 y un protocolo para el estudio de estas mutaciones en un solo paso y posterior minisequenciación, consistente en emplear de forma simultánea 3 primers con diferentes concentraciones, prescindiendo de la segunda ronda de amplificación (Figura 1).

Tras la puesta a punto del método (temperaturas de amplificación, mezclas y tiempos de reacción) se confirmó el protocolo en linfocitos aislados de sangre periférica. Se analizaron 20 linfocitos de cada uno de los padres (genotipos: C752T/ wt y G2584A /wt) previa lisis alcalina y amplificación tipo *Whole Genome Amplification* (GenomiPhi V2).

En cuanto al estudio en embriones la paciente se encuentra actualmente en protocolo de estimulación ovárica.

RESULTADOS

El estudio de informatividad permitió determinar los STRs informativos (D15S979, D15S202 y D15S127) y semi-informativos (D15S1046, D15S116) en la la pareja.

Las dos mutaciones se amplificaron de forma eficaz y según el método descrito, tanto en ADN de sangre periférica como en los linfocitos aislados. La eficacia de amplificación global fue del 97 %. No se detectó contaminación en ninguna de las células analizadas y la tasa de *allele drop-out* fue del 3%.

CONCLUSIÓN

El tiempo de análisis y la cantidad de ADN disponible en la célula biopsiada son limitaciones en DGP. La metodología descrita mejora la amplificación de mutaciones puntuales en una sola célula y permite acortar en 2 horas los tiempos de reacción en minisequenciación, así como reducir la manipulación, minimizando contaminaciones y errores diagnósticos. Tras la biopsia, el proceso que incluye la lisis alcalina, *whole genome amplification* y genotipado de las blastómeras requerirá un total de 8 horas, permitiendo la transferencia en día +4.

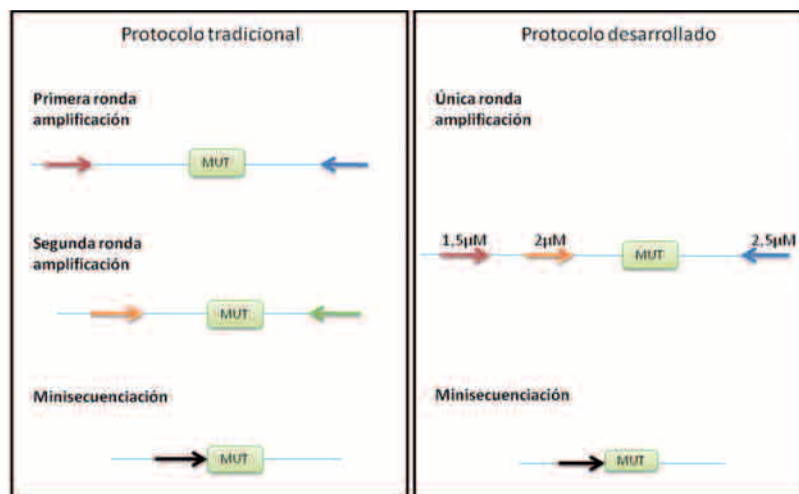


Figura 1. Esquema de los protocolos análisis de mutaciones en DGP. Protocolo tradicional y desarrollado

098: INFLUENCIA DE LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA EN LOS RESULTADOS CLÍNICOS Y PERINATALES DE CICLOS DE FIV CONVENCIONAL

D. Pabón, M. Molla, M. Ojeda, M. Martínez, N. Torres, L. Rodríguez, S. Portela, E. Muñoz, J. Remohí. IVI-VIGO e-mail: dina.pabon@ivi.esniality.es

INTRODUCCIÓN

La subjetividad en la apreciación de la morfología hace discrepar a muchos autores sobre el valor de la morfología estricta con la funcionalidad espermática y con el potencial fértil

del varón. La Organización Mundial de la Salud (OMS) consideró inicialmente normalidad cuando la proporción de espermatozoides normales era de un 50%, posteriormente bajó al 30%, después con el criterio estricto de Kruger cayó al 14% y con los nuevos

criterios de la OMS de 2010 se ha descendido al 4%. La mejor manera de estimar el efecto de la morfología de los espermatozoides es evaluando su impacto en los tratamientos de FIV convencional

OBJETIVO

Nuestro objetivo es evaluar la influencia de la morfología espermática en los resultados clínicos y perinatales de nuestros tratamientos de FIV convencional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis retrospectivo en los que se incluyen exclusivamente tratamientos de FIV convencional realizados en IVI-VIGO desde 01/06/2006 hasta el 30/06/2010. La base para valorar la morfología fue el criterio estricto de Kruger en el que la normalidad es considerada cuando hay más del 14% de espermatozoides morfológicamente normales. Para el estudio se dividieron 4 grupos según el porcentaje morfológico seminal normal (N): A: $\leq 4\%N$, B: $5-9\%N$, C: $10-13\%N$ y D: $\geq 14\%N$. Se relacionó la morfología con la tasa de fecundación, la tasa de gestación de cada ciclo de FIV y también con los resultados de embarazo clínico y estado de los Recién Nacidos Vivos (RNV) de los diferentes grupos. Los protocolos de estimulación de las pacientes fueron los rutinarios.

RESULTADOS

Se incluyen 313 ciclos de FIV en los que no encontramos diferencias significativas entre el número de embriones transferidos por ciclo, la edad de las pacientes, ni el número de espermatozoides usados en la fecundación de los ovocitos obtenidos. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las tasas de fecundación y gestación, cuando comparamos los resultados de semen con teratozoospermia de morfología normal $\leq 4\%$ (grupo A) con aquellos que tenían mayor porcentaje normal de espermatozoides. La tasa de la fecundación, gestación y RNV para los grupos fueron respectivamente A: 57.67%, 14.9% y 11,76%; B: 72.52%, 53.86% y 52.87%; C: 72.65%, 54.04% y 53.84%; D: 74.26%, 61.35% y 72,72%. Ninguno de los RNV hasta ahora, ha mostrado defectos congénitos. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la tasa de aborto, embarazo ectópico, parto prematuro, ni periodo gestacional medio. En los RNV no se han encontrado diferencias entre las tallas y pesos de los RNV en los cuatro grupos.

CONCLUSIÓN

Según nuestros resultados en ciclos de FIV convencional, existe una tendencia a mejorar los resultados de fecundación y gestación con el porcentaje de espermatozoides normales. Hemos encontrado diferencias significativas entre la tasa de fecundación y gestación entre el grupo A de morfología menor de 4% y el resto de grupos. La morfología de espermatozoides levemente anormal o normal no tiene influencia evidente en la tasa de gestación ni en los nacimientos. La morfología normal jugó en nuestro estudio un papel limitado en predecir los resultados y el estado de los recién nacidos vivos en ciclos de FIV convencional. La exactitud de la clasificación morfológica puede ser eficaz a la hora de aconsejar a los pacientes su tratamiento y sus expectativas, pero un estudio diseñado para este propósito con un número mayor de casos sería necesario para corroborar estos hallazgos.

099: ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS SEMINOGRAMAS DIAGNOSTICADOS SEGÚN LOS CRITERIOS DE LA OMS 1999 VS OMS 2010

L. Julià; M. Hugas; M. Fernández Reig; J. Sarquella Ventura
Unitat de Reproducció Humana i Diagnòstic Genètic. Clínica Girona.
e-mail: labfiv@girofiv.co

INTRODUCCIÓN

Los últimos años se ha planteando la necesidad de revisar los valores de referencia de los parámetros seminales que se analizan en el seminograma.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2010, ha presentado los nuevos criterios en los que se observa una tendencia a reducir los valores límite que permiten considerar un semen como normal.

Parece, por tanto que, con estos nuevos parámetros se aumentará el conjunto de seminogramas con resultado de normozoospermia.

Esta circunstancia podría tener su importancia a la hora de establecer las indicaciones masculinas de los tratamientos en los programas de reproducción asistida.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio es analizar el grado de variación y su significancia en los diagnósticos de los seminogramas

según si se utilizan los valores de referencia que establece la OMS de 1999 o los valores que establece la OMS de 2010.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo de 739 seminogramas de pacientes que acudieron a nuestro centro para realizar un estudio de infertilidad entre los años 2005 y 2010.

Las muestras de semen de los pacientes fueron recogidas por masturbación y siguiendo las directrices que marca la OMS.

Se valoraron los siguientes parámetros seminales: volumen, concentración, movilidad total, movilidad grado a, b y c y morfología.

De cada una de las muestras, después de efectuar el seminograma, se realizaron dos diagnósticos: uno con los criterios de la OMS de 1999 y el otro con los criterios de la OMS de 2010.

Las muestras se agruparon únicamente según si el diagnóstico era: normozoospermia, oligozoospermia, astenozoospermia y teratozoospermia. No se tuvieron en cuenta, por tanto, la combinación de más de un parámetro.

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente mediante la prueba-chi del paquete estadístico SPSS

11.5. Considerando estadísticamente significativos los valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Resultados y porcentajes obtenidos para cada uno de los diagnósticos según los criterios de la OMS utilizados:

	Normozoospermia	Oligozoospermia	Astenozoospermia	Teratozoospermia
OMS 1999	244 (33%)	216 (57%)	392 (70%)	269 (92%)
OMS 2010	488 (67%)	163 (43%)	167 (30%)	24 (8%)
	$p < 0.0001$	$p = 0,9393$	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$

Después de analizar los resultados se puede ver que en los diagnósticos normozoospermia, astenozoospermia y teratozoospermia existen diferencias significativas según si se utilizan los criterios de la OMS 99 o los de 2010. Sin embargo no hay diferencias significativas en el diagnóstico de la oligozoospermia.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo nos demuestran que aplicando los criterios de referencia de la OMS 2010 aumenta significativamente el número de seminogramas diagnosticados con normozoospermia y sin embargo se reducen de forma significativa los

diagnósticos con astenozoospermia y teratozoospermia respectivamente.

Este hecho se puede atribuir a la disminución de los valores de referencia OMS 10 vs OMS 99, en los parámetros que se tienen en cuenta para realizar estos diagnósticos.

En el caso de las oligozoospermias puede ser lógico que no observemos diferencias porque ambas clasificaciones de la OMS tienen valores de referencia muy parecidos para el parámetro que valora este diagnóstico (nº spz totales).

Según la nueva valoración se establecerá una reestructuración de las indicaciones de los tratamientos de reproducción,

observándose una reducción de las indicaciones masculinas.

Con la experiencia actual, también se constata que los anteriores valores de referencia eran quizás demasiado estrictos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. Cuarta Edición. Ed. Panamericana 2001.
- WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. Fifth edition.

100: CRIOPRESERVACIÓN DE ZIGOTOS ANTE EL RIESGO DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA

N. Gimbernat, J. Puig, J. Reinal, I. Vila, A. Cuartiella, A. Prat, M. Font.
 Centre de Genètica Girona
 e-mail: info@centredegeneticagirona.com

INTRODUCCIÓN

Cuando hay un alto riesgo de hiperestimulación ovárica, una de las estrategias para evitarla es congelar todos los cigotos y realizar la transferencia en un ciclo posterior, una vez recuperados los niveles hormonales.

OBJETIVO

Analizar los resultados de la congelación electiva de cigotos en nuestro centro y valorar su continuidad como estrategia válida frente al riesgo de hiperestimulación ovárica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Realizamos un estudio retrospectivo de 29 ciclos de fecundación in vitro con riesgo de hiperestimulación ovárica entre mayo 2004 y enero 2010. Se trata de 27 pacientes de edades comprendidas entre 28 y 41 (33,4 de

media) y con un nivel de estradiol el día de la punción folicular de 3.702,93 pg/ml de promedio (mín 2.192, máx 5.600). Media de folículos puncionados 25, promedio 19 oocitos/punción.

En todos los ciclos se congelaron todos los cigotos (promedio 11 cigotos/ciclo) con un total de 321 cigotos congelados según el protocolo lento de Lasalle et al. 1985.

La descongelación se realizó el tercer día de tratamiento hormonal sustitutivo. Se realizaron 49 transferencias (1,8 trans/paciente). En 40 de los casos los pronúcleos se dejaron en cultivo hasta el día siguiente (+2) y se transfirieron en fase de 4 células. En 4 casos se alargó el cultivo a día +3 y en 5 hasta blastocisto, transfiriéndose en día +5/+6.

De los 244 cigotos descongelados se seleccionaron 108 para transferir: en 3 casos transferencia de un único

embrión, 33 casos 2 embriones y en 13 casos 3 embriones (promedio 2,2 embriones/criotransfer). No se canceló ningún ciclo. De las 27 pacientes, 6 desarrollaron hiperestimulación ovárica (22,2%), 3 leves y 3 moderadas con evolución favorable.

RESULTADOS

En los 29 ciclos se obtuvieron 18 gestaciones clínicas (36,7 % / transferencia, 62 %/ciclo, 66,6 %/paciente), 4 abortos de primer trimestre, y las 14 restantes finalizaron con éxito. Por lo tanto la tasa de gestación evolutiva y niño en casa por criotransfer fue de 28,5 %, 48,2 % por ciclo y 51,58 % por paciente. Tasa de implantación del 18,5 % (20 embriones implantados de los 108 transferidos). De los 14 embarazos, 2 fueron gemelares (14,2 %): en ambos casos las pacientes eran menores de 35 años (30 y 32). En dos ciclos se

consiguieron 2 embarazos evolutivos a partir de una única estimulación hormonal y punción ovárica, aunque en dos transferencias consecutivas: en el primer caso con resultado de 1 niño en casa /transferencia (1+1) y en el segundo 3 niños en casa (1+2).

CONCLUSIONES

Según los datos analizados la criopreservación de cigotos presenta unos resultados excelentes: permite minimizar el riesgo de hiperestimulación y realizar varias transferencias a partir de una única estimulación hormonal y punción ovárica. La tasa de gestación evolutiva (48,2 % por ciclo y 51,58 % por paciente) respalda totalmente la opción como muy rentable. Estos datos pueden mejorar aún a medida que las nuevas técnicas de congelación (vitrificación) nos permitan una más alta recuperación embrionaria post-descongelación.

101: EFECTO DE LA ADICIÓN DE HYALURONAN EN EL MEDIO DE CULTIVO SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO Y CRIOTOLERANCIA DE EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS IN VITRO

Roser Morató¹, Dolors Izquierdo², Maria Teresa Paramio², Teresa Mogas¹

¹Departament de Medicina i Cirurgia Animals. ²Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona.

e-mail: rmoratomolet@gmail.com

Las posibilidades de aplicación de las tecnologías reproductivas *in vitro* son múltiples y presentan un elevado interés en el caso del ganado bovino. La producción de embriones *in vitro* (PIV) a partir de ovocitos obtenidos de vacas de elevado valor genético es una herramienta que ofrece nuevas perspectivas para la aceleración del progreso genético. Si a la producción *in vitro* de embriones, le añadimos los procesos de criopreservación, la conservación de embriones animales y su almacenaje permite la conservación del material genético del macho y la hembra y tiene un potencial enorme en la protección y manejo de especies y en el mantenimiento de su heterocigocidad genética. La criotolerancia de los embriones obtenidos *in vitro* es mucho menor a la de los embriones *in vivo*. Se cree que

esta diferencia se puede mejorar bien modificando las condiciones de cultivo o bien modificando los protocolos "estándares" de criopreservación de los embriones. Diferentes autores han descrito el potencial del ácido hialurónico (hyaluronan; HA), un glicosaminoglicano presente en los fluidos oviductales y uterinos bovinos, para mejorar el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto y aumentar su supervivencia tras su criopreservación (Block *et al.*, *Theriogenology* 71: 1063-71. 2009).

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la adición de hyaluronan durante el período de cultivo embrionario *in vitro* en el desarrollo embrionario y su criotolerancia tras ser sometidos a un proceso de vitrificación/calentamiento. Para ello, cigotos

bovinos obtenidos tras un procesos de MIV/FIV, se asignaron aleatoriamente a uno de los cuatro medios de cultivo: (1) SFB; (2) BSA; (3) SFB+HA; (4) BSA+HA. A las 48h post-inseminación (pi), se valoró la división embrionaria mientras que el desarrollo hasta el estadio de blastocisto se evaluó a los días 7 y 8 pi. A día 7 pi, se vitrificaron aquellos blastocistos expandidos y eclosionados. Después de su calentamiento, los blastocistos se transfirieron de nuevo a las gotas de cultivo correspondiente y se valoró su supervivencia a las 3 y 24h posteriores. Paralelamente, a día 7 pi, se fijaron algunos de los blastocistos para la tinción diferencial ICM/TE.

La adición de 1 mg/mL de hyaluronan al cultivo embrionario no tuvo efecto en los porcentajes de división embrionaria (72.9%; 67.1%; 71.8% y 70.5%

para los grupos SFB, BSA, SFB+HA y BSA+HA, respectivamente) ni tampoco en el desarrollo hasta el estadio de blastocisto a día 7 (13.7%; 12.9%; 15.0% y 15.1% para los grupos SFB, BSA, SFB+HA y BSA+HA, respectivamente). A nivel de supervivencia después de la vitrificación/calentamiento, la adición de hyaluronan proporcionó porcentajes similares de blastocistos re-expandidos y eclosionados a las 3 (~76%) y a las 24h post-calentamiento (~64%).

La adición de hyaluronan al cultivo no mostró diferencias significativas en el número total de células de los blastocistos con respecto a sus controles. Sin embargo, se observó un incremento significativo de la ratio ICM/TE en los blastocistos procedentes del cultivo embrionario BSA suplementado con HA comparado con su control (0.44±0.12 y 0.31±0.05; BSA+HA y BSA respectivamente). Estos resultados sugieren que la adición de hyaluronan

al cultivo de embriones bovinos no tuvo efectos en los porcentajes de división, blastocistos o supervivencia tras un proceso de vitrificación/calentamiento. No obstante, la calidad de los blastocistos medida como la ratio ICM/TE aumentó significativamente para aquellos blastocistos obtenidos del medio de cultivo suplementado con BSA y hyaluronan.

102: ELONVA: PRIMEROS CICLOS EN EL INSTITUTO BERNABEU

M. A. Carracedo, J. Ten, J. Guerrero, R. Bernabeu, J. Llácer
 CENTRO: Instituto Bernabeu
 e-mail: jten@institutobernabeu.com

INTRODUCCIÓN

Hasta ahora, las pacientes que precisan recibir gonadotropinas para la estimulación ovárica se veían obligadas a administrarse inyecciones diarias debido a la vida media de las mismas. Un posible error en la dosificación de la medicación, la angustia relacionada con el número de inyecciones o la rigidez en los horarios generan una gran carga psicológica, lo que puede repercutir en las tasas de éxito e incluso provocar el abandono del tratamiento.

La Corifolotropina alfa (Elonva) se ha diseñado como un estimulante folicular sostenido con el mismo perfil farmacodinámico que la FSH pero con una duración prolongada de la actividad. Se consiguió añadiendo el 7 péptido carboxi-terminal de la subunidad β de la gonadotropina coriónica humana (hCG)

a la cadena β de la FSH humana. Por su capacidad para iniciar y mantener el crecimiento folicular múltiple durante una semana entera, una única inyección subcutánea de la dosis recomendada de Elonva puede sustituir las siete primeras inyecciones de cualquier preparación de FSH diaria en un ciclo de estimulación ovárica.

OBJETIVO

Presentación de los resultados de los primeros ciclos estimulados con Elonva en el Instituto Bernabeu.

MATERIAL Y MÉTODO

Analizamos los resultados clínicos y de laboratorio de nuestra experiencia inicial postcomercialización. Se trató de 6 ciclos de estimulación ovárica para FIV realizados en el Instituto Bernabeu

durante el mes de marzo de 2011. Las estimulaciones se iniciaron con una inyección de Elonva 150 en protocolo con antagonistas en pauta fija y se completó con la administración de FSHr (Gonal F o Puregon) o HMG (Menopur) a partir del 8º día de estimulación. Se desencadenó la maduración folicular con una dosis de hCG (Ovitrelle) y 36 horas después se realizó la punción ovárica y se inseminaron los ovocitos mediante FIV convencional o ICSI dependiendo de los antecedentes de la pareja. 18-20 horas post-inseminación se valoró la fecundación. La transferencia embrionaria se realizó en día 3, día 4 o día 5. Se valoró la β-hCG en sangre 13 días después de la punción ovárica considerándose positiva cuando el valor fue >6 mUI/mL.

RESULTADOS

	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4	Ciclo 5	Ciclo 6
Nº Ovoc. Recup.	10	12	14	9	22	17
TRA	ICSI	ICSI	ICSI	ICSI	FIV	ICSI
Nº MII	10	5	9	7	-	13
Nº Ovoc. Fecund.	6	4	7	5	11*	13
Nº Embr. Transf.	2	2	2	2	2	1
Día Transferencia	3	2	5	3	5	4
Clasificación ASEBIR	A / A	A / A	A / B	A / A	A / A	A
Nº Embr. Cong.	-	-	2	-	4	9
b-hCG	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Evolución	-	2 sacos	2 sacos	-	1 saco	-

*5 ovocitos inmaduros el día de la fecundación

CONCLUSIONES

La experiencia inicial con el uso de Corifolitropina α en nuestro laboratorio fue satisfactoria mostrando características similares a otros protocolos de estimulación.

Los datos preliminares en su uso post-comercialización reafirman la disminución en la carga física y psicológica durante la estimulación ovárica sin perjuicios en la eficacia.

En pacientes con normorespuesta, Elonva puede ser a corto-medio plazo el fármaco de elección para la estimulación ovárica.

103: LOS VALORES DE CA-125 EVALUADOS EN CONDICIONES BASALES NO SON PREDICTIVOS DEL RESULTADO DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

JC. Martínez, M. Nicolás, L. Fernández, P. Albero, J. Landeras.
IVI Murcia
e-mail: juancarlos.martinez@ivi.es

INTRODUCCIÓN

La utilidad clínica fundamental del CA-125 es su uso como marcador tumoral en el cáncer de ovario. El Ca-125 es una glicoproteína producida por el epitelio de las trompas de Falopio, cérvix, por células mesoteliales peritoneales, así como por el endometrio de mujeres ovulatorias, y presenta la particularidad de que es fácilmente medible en circulación sanguínea. Por ello ha sido usado como indicador de receptividad endometrial y diversos estudios se han llevado a cabo evaluando su utilidad como factor pronóstico de embarazo tras fecundación in vitro con resultados contradictorios.

OBJETIVO

El objetivo del presente estudio es evaluar la utilidad de los niveles basales de CA-125 como factor pronóstico del éxito de los tratamientos de inseminación intrauterina.

MATERIAL Y MÉTODOS

100 mujeres de edades comprendidas entre 18 y 37 que acudieron a la clínica IVI Murcia para la realización de su primer ciclo de inseminación intrauterina fueron incluidas en el presente estudio. A

todas las mujeres incluidas en el estudio se les realizó una histerosalpingografía con objeto de comprobar su integridad tubárica. Las inseminaciones se realizaron tras estimulación ovárica con FSH-r y las pacientes fueron monitorizadas mediante ecografía transvaginal y evaluación de los niveles de estradiol. Las dosis de gonadotropinas fueron individualizadas atendiendo a edad, valores hormonales y respuesta a la estimulación.

Cuando al menos un folículo presentaba un diámetro igual o superior a 17mm se administraron 6500 UI de gonadotropina coriónica humana y se realizaron dos inseminaciones a las 12 y 36 horas posteriores a su administración.

Las muestras sanguíneas para determinar los valores de Ca-125 se tomaron entre el 3 y 5 día del ciclo menstrual y el test de embarazo se realizó tras 14 días de la última inseminación.

Los pacientes fueron divididos en 2 grupos atendiendo al éxito del tratamiento. Grupo A (grupo de embarazadas) y grupo B (grupo de no embarazadas). Se realizó un análisis estadístico mediante ANOVA y Curvas ROC.

RESULTADOS

27 de las mujeres incluidas en el estudio lograron un embarazo tras la inseminación. Ambos grupos presentaban características homogéneas tanto en edad como en número de espermatozoides inseminados

No se observaron diferencias significativas en los valores de CA-125 entre grupo de A y B ($15,2 \pm 1,9$ vs $22,3 \pm 2,7$, $p=0,13$). El análisis mediante curvas ROC no encuentra valor predictivo de los valores de CA-125 con los índices de embarazo (área bajo la curva $0,542$, $p > 0,05$)

CONCLUSIONES

Aunque los valores de CA-125 son ligeramente inferiores en el grupo de pacientes que quedaron embarazadas frente a las que no se quedaron, no se observa una diferencia estadísticamente significativa. De ahí que este marcador, medido en condiciones basales, no presenta ningún valor predictivo en los ciclos de inseminación artificial. Estos datos concuerdan con publicaciones previas sobre su valor predictivo en los tratamientos de fecundación in vitro (Bradenberg et al., 1998; Fish et al., 2004) y en ICSI (Sohrabvand et al., 2004).

	Grupo A	Grupo B	p
Edad	31,8 \pm 0,6	32,2 \pm 0,4	0,57
Nº de espermatozoides inseminados	9.4 \pm 1,5 x 10 ⁶	11,1 \pm 0,9 x 10 ⁶	0,33

104: VALORACIÓN DE LA DIVISIÓN TEMPRANA EMBRIONARIA EN NUESTRO CENTRO

M F. Fernández, E M. Martín, E. Cogollos, A. Gallego, E. Pérez de la Blanca, F. Martínez.
Hospital Quirón Málaga
e-mail: mafernandez.mlg@quiron.es

INTRODUCCIÓN

Según la bibliografía, la división temprana de cigotos es un parámetro indicador del potencial de desarrollo de embriones de buena calidad.

La transferencia de embriones que se dividen tempranamente se asocia con mayores tasas de implantación, aunque aún existe cierta controversia en si realmente es un parámetro esencial o bien un parámetro secundario.

En nuestro centro es un parámetro que anotamos desde hace tiempo para tener más información de cada embrión, aunque no lo teníamos en cuenta a hora de elegir los embriones a transferir.

Así el objetivo de este estudio fue valorar si los embriones elegidos

para la transferencia en un ciclo de reproducción asistida habían tenido o no división temprana previa.

MATERIAL Y MÉTODO

Se trata de un estudio retrospectivo basado en los ciclos FIV-ICSI realizados entre 2009 y 2010 en nuestro centro. Se seleccionaron aquellos en los que se comprobó la aparición o no de división temprana entre las 24-26 horas tras inseminación.

En total fueron 110 ciclos en los que se había anotado la división temprana. El 76% de los embriones elegidos para ser transferidos (por poseer la mayor calidad morfológica del *pool* del que proceden) habían tenido división embrionaria temprana.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos nos indican que la división temprana parece estar asociada al desarrollo de embriones de mejor calidad en día +3 de cada ciclo de reproducción asistida, ya que son en la mayoría de los casos los elegidos para ser transferidos. Sin embargo, este parámetro no parece estar relacionado con una mayor tasa de embarazo clínico.

Quizás se requeriría un estudio mayor para poder obtener resultados definitivos.

En cambio la división temprana sí que nos va a servir como herramienta a la hora de elegir los embriones de mayor potencial cuando tengamos que hacer transferencia en día +2.

	Transferencia de embriones con DT	Transferencia de embriones sin DT
n	78	32
Edad media*	34.9	35.1
Media embriones transferidos*	2.1	2.2
% embriones transferidos que tenían división temprana	76	0
% embarazo clínico*	46.8	43.6

*No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. (Programa SSPS 15.0)

105: ARRAY-CGH DE OLIGOS EN DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL DE SCREENING DE ANEUPLOIDÍAS

M. Martínez-Fresno¹, A. Gómez Duro¹, J. Muñoz², P. Eibes Peteiro¹, M. Calvente³, J. Suela³, E. Fernández¹

¹Geniality Diagnóstico Genético, ²Instituto Madrileño de Fertilidad, ³NIMGenetics
e-mail: efgarcia@geniality.es

INTRODUCCIÓN

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) ha sido tradicionalmente la técnica empleada en el diagnóstico genético preimplantacional para el *screening* de aneuploidías (DGP-SA), sin embargo, es de todos conocido las limitaciones que esta técnica presenta. En los últimos meses, el *array*-CGH está sustituyendo a la FISH ya que esta técnica de diagnóstico genético permite analizar el genoma completo del embrión al mismo tiempo, en busca de alteraciones de ganancia o pérdida de material genético. Presentamos el primer embarazo obtenido por DGP-SA, con una plataforma de *array*-CGH basada en la plataforma de oligos (embryoarray®).

OBJETIVO

Aplicación clínica del *array*-CGH de oligos (embryoarray®) al DGP de *screening* de aneuploidías cromosómicas en una sola célula.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pareja que consulta para un DGP de *screening* de aneuploidías tras 2 ciclos de fecundación *in vitro* + DGP-SA mediante FISH, sin transferencia, realizados en otro centro. La mujer tiene 40 años de edad y el marido presenta azoospermia obstructiva (ABVD).

- 1 ciclo: Biopsia de testículo, ICSI-DGP-SA mediante FISH: 18 ovocitos, 10 MII, 5 fecundados → 3 biopsiados → 3 aneuploides

- 2º ciclo: Biopsia de testículo, ICSI-DGP-SA mediante FISH: 25 ovocitos, 15 MII, 6 embriones → 4 biopsiados → 3 aneuploides, 1 normal que no evoluciona
- 3º ciclo: Biopsia de testículo en fresco. ICSI-DGP-SA mediante *array*-CGH (medios de cultivo Global). 20 ovocitos, 17 MII, 7 fecundados → 5 biopsiados → 4 aneuploides, 1 normal (blastocisto hatching) Transferido → Embarazo evolutivo

Las células biopsiadas se sometieron a lisis alcalina y amplificación genómica previa mediante GenomePlex *Whole Genome Amplification* (WGA) Kit (Sigma-Aldrich). El análisis mediante *array*-CGH se llevó a cabo mediante la plataforma embryoarray®, *array* de oligos de 60.000 sondas (Agilent Technologies) con adaptaciones al análisis de una sola célula. El paquete informático que se empleó para llevar a cabo el análisis de datos está formado por dos sistemas: Feature extraction 10.1 y DNA Analytic 4.1 (se usaron como estadísticos ADM-2 con un nivel de significancia de 4 y ventana de 10Mb).

RESULTADOS

De los 5 embriones biopsiados, 3 de ellos presentaron aneuploidías, uno era diploide normal y otro no pudo ser diagnosticado (embrión 4), este embrión se volvió a biopsiar en día +5 y se vitrificó a la espera de resultados. Posteriormente se diagnóstico como aneuploide.

Embrión Resultado

Embrión	Resultado
1	Aneuploide: -13; +14
2	Aneuploide: +12
3	Aneuploide: +18
4	Aneuploide: -12, +15, -21
5	Diploide

CONCLUSIONES

Habitualmente el enfoque técnico de este tipo de diagnóstico se ha llevado a cabo mediante FISH de al menos 9 cromosomas (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X e Y) en blastómeras fijadas tras biopsia en día +3. Esto suponía dejar de analizar el 48% del genoma del embrión, en el mejor de los casos. En el caso que aquí se describe, 3 de los 4 embriones diagnosticados como aneuploides presentaban anomalías numéricas detectadas mediante *array*-CGH en cromosomas no incluidos en el análisis rutinario mediante FISH. El embrión 2, presentaba una ganancia del cromosoma 12 que no hubiera sido detectada mediante FISH-9 cromosomas, pudiendo concluir en la transferencia de este embrión. El *array*-CGH mejora la selección y transferencia de embriones diploides permitiendo el análisis de los 23 pares de cromosomas incrementando así, en casos con indicación como el que se presenta, la tasa de implantación y de embarazo.

106: INFLUENCIA DEL FACTOR ESTATURA EN LA CALIDAD SEMINAL

A. Yoldi; A. Vaquero; JP. Ramírez, JA. Castilla.
 CEIFER. (Centro de Estudios e investigación de la Fertilidad). Granada
 e-mail: alberto.yoldi@ceifer.com

INTRODUCCIÓN

La significación de la estatura en los marcadores de calidad seminal no ha sido estudiada hasta el momento ya que es una característica que no parece que influya sobre los parámetros seminales. La mayoría de los estudios de calidad seminal relacionados con esta variable se centran en el índice de masa corporal, al representar este índice más objetivamente las características del individuo ya que relaciona las variables estatura y peso en un solo parámetro.

OBJETIVOS

Estudiar si la estatura presenta influencias significativas sobre los

principales parámetros de calidad seminal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han estudiado 2444 muestras seminales procedentes de aspirantes a donante de semen que han acudido a nuestro centro desde el año 1993 hasta el 2010. Se ha analizado una muestra por individuo, empleando los parámetros definidos por el Manual OMS en sus diferentes ediciones. El semen se ha obtenido por masturbación en nuestro centro, con un período de abstinencia de 3-5 días. Se ha utilizado un microscopio de contraste de fases con placa termocalefactada a 37°C. El personal

investigador se encuentra 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. La edad media de la serie es de 22.17 años (± 4.18 SD).

Los parámetros seminales analizados han sido: concentración, volumen, nº total de espermatozoides eyaculados y % espermatozoides progresivos (A+B).

RESULTADOS

Tras eliminar los *outliers* mediante el recorrido intercuartílico, obtenemos la siguiente estadística descriptiva:

Estatura		Concentración			Volumen			% Progresivos			Nº total/eyac.		
		n	\bar{x}	s.d.	n	\bar{x}	s.d.	n	\bar{x}	s.d.	n	\bar{x}	s.d.
< 1.70 m	1	301	79.8	49.20	294	3.8	1.42	306	45.3	13.09	303	267.6	176.56
1.71 a 1.75 m	2	545	81.2	49.50	539	3.7	1.37	549	45.7	13.58	549	273.9	180.80
1.76 a 1.80 m	3	729	82.1	49.81	704	3.7	1.42	721	46.3	13.37	733	275.1	185.39
1.81 a 1.85 m	4	447	79.1	47.47	442	3.8	1.42	451	45.1	13.75	454	276.3	185.91
1.86 a 1.90 m	5	229	79.3	46.55	222	4.1	1.46	232	46.1	13.93	225	279.5	179.58
> 1.91 m	6	76	78.9	51.17	78	4.0	1.50	77	46.7	14.76	78	287.1	184.88
Total		2327	80.6	48.91	2279	3.8	1.42	2336	45.8	13.60	2342	274.9	182.58

Tras emplear el test de normalidad Kolmogorov-Smirnov, ninguna de las variables estudiadas presenta una distribución normal. Por esta razón vamos a desarrollar las comparativas de los parámetros seminales mediante métodos no paramétricos.

Mediante el test de Kruskal-Wallis, vemos que, de las cuatro variables estudiadas, tan sólo el volumen seminal muestra un aumento significativo proporcional al aumento de la estatura (sig.=0.033). Relacionado con este

aumento del volumen seminal, hemos apreciado también un incremento de la cantidad total de espermatozoides por eyaculado; aunque, en este caso, no presenta significación estadística.

CONCLUSIONES

En nuestra población de 2444 jóvenes aspirantes a donante de semen, hemos apreciado un incremento significativo del volumen seminal, proporcional al aumento de la estatura.

El resto de las variables seminales estudiadas no han presentado diferencias significativas relacionadas con la estatura.

107: INFLUENCIA DE LA VACUOLIZACIÓN Y/O ACUMULACIÓN DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO LISO EN OVOCITOS DE CICLOS FIV/ICSI

B. González, A. Clavero, A. Rosales, I. Molina, J.A. Castilla, E. Palacios, S. Carrillo, J. Mozas
 Unidad de Reproducción Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada
 e-mail: beukasoto@gmail.com

INTRODUCCIÓN

En ciclos FIV/ICSI podemos encontrarnos ovocitos con diferentes fenotipos dismórficos como acumulación de retículo endoplasmático liso (REL) o presencia de vacuolas rodeadas de membrana y llenas de fluido. La vacuolización citoplasmática se considera un proceso de atresia ovocitaria. La acumulación de REL se observa como vacuolas translúcidas de tamaño pronuclear, y es claramente distinguible morfológicamente de las vacuolas llenas de fluido bajo microscopio invertido. Los mecanismos responsables de la aparición de REL aún se desconocen.

Algunos artículos afirman que la morfología de los ovocitos podría no afectar a los resultados de ciclos FIV/ICSI, sin embargo otros demostraron que las tasas de fecundación y división se redujeron cuando se transfirieron embriones que procedían de ovocitos dismórficos.

OBJETIVO

En este estudio retrospectivo, hemos analizado la influencia de la presencia de al menos un ovocito con vacuolización o con acúmulo de REL en los resultados de ciclos FIV/ICSI así como su frecuencia de aparición.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los pacientes incluidos en el estudio pertenecían al programa FIV/ICSI de

la Unidad de Reproducción del H.U. Virgen de las Nieves de Granada del año 2010 (532 pacientes, 608 ciclos). Se identificaron 3 grupos de estudio: grupo con al menos un ovocito con acúmulo de REL (14 pacientes), grupo con al menos un ovocito vacuolado (20 pacientes) y grupo control, sin ovocitos con los disformismos anteriores, correspondiente a un mes del año 2010 cogido al azar (67 pacientes).

En todos ellos se valoraron los datos clínicos (causa de esterilidad, protocolo de estimulación, días de estimulación, unidades de FSH, edad media de la paciente) y de laboratorio (número de ovocitos obtenidos, ovocitos en metafase II (MII), fecundados, calidad embrionaria, embriones transferidos, embriones congelados, tasa de gestación y tasa de aborto).

Para la comparación de estas variables entre grupos se utilizó el test X^2 y un análisis de la varianza. Se realizó un estudio de potencia y tamaño muestral.

RESULTADOS

De los 608 ciclos realizados durante el 2010, 14 (2.3%) presentaron algún ovocito con acumulación de REL y 20 (3.2%) mostraron al menos un ovocito con vacuolización. Ninguna paciente que presentara acumulación de REL u ovocitos vacuolados había tenido ciclos previos con ovocitos de estas características ni volvió a presentarlos en el siguiente ciclo.

Si analizamos los datos clínicos no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos. Tampoco se observaron diferencias significativas en los diferentes parámetros de laboratorio evaluados entre los 3 grupos a estudiar.

Aunque se encontró una elevada tasa de abortos (50-66.6%) en ambos grupos de anomalías ovocitarias, ésta no fue estadísticamente significativa al compararla con la observada en el grupo control. Se observó una tendencia a una menor tasa de gestación evolutiva por transferencia en las pacientes en las que algún ovocito presentó acúmulo de REL (7.1%), frente al grupo con vacuolas (30%) y el grupo control (26.1%).

Teniendo en cuenta las diferencias obtenidas en el porcentaje de gestación evolutiva por transferencia, se estimó que para un error $\alpha=0.05$ y una $\beta=0.10$ se necesitaría al menos unos 77 ciclos en cada grupo.

CONCLUSIONES

La presencia de acúmulo de REL y vacuolas en ovocitos tras estimulación ovárica es un hecho infrecuente, además de ser ciclo-dependiente más que mujer-dependiente, dado que no suele repetirse en la misma mujer. Es necesario aumentar el tamaño muestral para confirmar que la presencia de acúmulo de REL en al menos un ovocito es un marcador de mal pronóstico en ciclos FIV/ICSI.

108: PRESENCIA DE UN SOLO NUCLÉOLO EN PRONÚCLEOS DÍA 1 (PN RATÓN) EN EMBRIONES TRANSFERIDOS Y SUS EFECTOS EN CICLOS DE ART EN IVI BARCELONA (2004 - 2010)

Jiménez JP.¹, Teruel J.¹, Florensa M.¹, Martín M.¹, Pellicer A.², Ballesteros A.¹, Calderón G.¹

¹IVI Barcelona; ²IVI Valencia

e-mail: juanpitazo@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La presencia de un único precursor pronucleolar en pronúcleos de día 1 (PN ratón) en embriones humanos es considerada como una anomalía grave, evitándose, en la medida de lo posible, la transferencia de los embriones que presentan esta morfología.

OBJETIVOS

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto en el rendimiento reproductivo de la presencia del valor PN ratón en embriones transferidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis retrospectivo de 319 ciclos con al menos 1 embrión de la cohorte en los que se observó un solo nucléolo en pronúcleo de día 1. Los 319 ciclos se dividieron en ciclos de donación y ciclos autólogos que a su vez fueron divididos en otros 3 grupos en función de las características de los embriones transferidos.

i Ciclos en los que todos los embriones transferidos presentaron PN ratón.

ii Ciclos en los que al menos 1 embrión transferido presentó PN ratón.

iii Ciclos en los que ningún embrión transferido presentó PN ratón pero en la cohorte sí que se presentó el valor morfológico PN ratón en al menos 1 embrión.

Los resultados se compararon con el resto de ciclos del mismo periodo según su origen ovocitario (donación o autólogo). Las tasas de gestación clínica (TGC), implantación (TI), embarazo gemelar (Tgem) y aborto clínico (AbClin) fueron comparadas estadísticamente usando la prueba de χ^2 (TGC, Tgem y Ab Clin) y test de mann-whitney (edad y TI)

RESULTADOS

En ambos grupos la presencia del marcador PN ratón en los embriones

transferidos supone una reducción de la TGC, TI y aumento del aborto, estos resultados fueron más acentuados en el grupo de ovocitos autólogos frente al grupo de ovocitos donados, los cuales presentaron mejores tasas.

CONCLUSIONES

La presencia de un solo nucléolo en pronúcleo de día 1 en embriones transferidos compromete en gran medida el potencial reproductivo de los mismos, especialmente en ciclos autólogos, en los que se observa una peor tasa de implantación, menor gestación clínica así como con una mayor tasa de aborto, estos resultados podrían deberse a una mayor calidad de los ovocitos donados frente a una peor calidad de los autólogos, se evidencia que en los ciclos de ovocitos donados la presencia de un solo nucléolo en pronúcleo de día 1 tiene efectos más moderados.

Donación	Control	iii	ii	ii2	i
Casos	3255	151	24	14	2 *
Edad %	41,16	41,61	41,59	41,57	40,05
TGC %	59,6	60,93	66,67	42,86	100
TI %	42,79	46,13	45,83	42,86	50
Tgem %	38,75	46,73	37,5	100	0
AbClin %	17,7	22,83	25	33,3	0
Autólogos	Control	iii	ii	ii2	i
Casos	2358	88	36	21	15
Edad %	36,27	35,75	36,12	36,18	36,93
TGC %	48,85	46,59	50	9,52	6,67
TI %	34,6	34,12	25	8,33	5,88
Tgem %	31,6	41,46	16,67	100	0
AbClin %	15,28	19,51	27,78	0	100

Tabla resumen resultados. Grupo ii2: Ciclos en los que al menos 1 embrión transferido presentó PN ratón y se produjeron tasas de implantación del 0 o 100 %, este grupo no fue sometido a análisis estadístico, * Grupo estadísticamente no significativo.

109: IDENTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MYH11 Y PF4V1 EN LAS CÉLULAS DEL CÚMULUS TRAS ESTIMULACIÓN OVÁRICA MEDIANTE ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL: IMPLICACIONES SOBRE SU POSIBLE FUNCIÓN EN LA MADURACIÓN OVOCITARIA

V. García-Láez, D. Beltrán, J.M. De los Santos, F.J. Esteban, J. Horcajadas, J.A. Martínez-Conejero, M.J. de los Santos
IVI Valencia - INCLIVA
e-mail: garcialaez@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

MYH11, cadena pesada de miosina y PF4V1, receptor G-protein-coupled PAF, son genes que codifican moléculas relacionadas con la regulación de la angiotensina II y angiogénesis, el primero induciendo la síntesis de angiotensina II y el segundo inhibiéndola. Puesto que la mayoría de los protocolos utilizados en FIV requieren la utilización de gonadotropinas y una dosis final de hCG con el fin de obtener un crecimiento multifolicular y madurez ovocitaria, es lógico pensar que dicha situación, podría influir en los procesos relacionados con la ovulación y la maduración ovocitaria.

OBJETIVOS

El objetivo de este estudio fue analizar el efecto de la estimulación ovárica sobre el transcriptoma de las células del cúmulus (CC), células en contacto íntimo con el ovocito, utilizando donantes de ovocitos sometidas a ciclos naturales modificados y comparándolas con ciclos estimulados.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio se incluyeron un total de 8 donantes divididas en dos grupos: uno formado por 4 donantes

sometidas a ciclo natural modificado y otro formado por 4 donantes sometidas a protocolos de hiperestimulación ovárica con agonistas de GnRH y con FSH recombinante. Las CC fueron aisladas mecánicamente del ovocito, entre dos y cuatro horas después de la obtención del ovocito e inmediatamente guardadas en Trizol y almacenadas a -80°C . Después de la extracción del ARN de las CC se realizó la amplificación lineal mediante el WT-Ovation Pico RNA Amplification System (NuGEN Technologies). El ADNc de las 8 muestras se hibridó con el Whole Human Genome Oligo Microarray (Agilent Technologies). El análisis de imagen se realizó mediante el Software GenePix Pro 6.0. Para las comparaciones se utilizaron tests no paramétricos. Los genes fueron considerados como sobre o infra-expresados cuando el $p < 0.05$ y el *fold change* fue mayor de 2.

La validación de los *microarrays* fue realizada en un total de 19 CC adicionales (9 procedentes de ciclos naturales y 10 de estimulados) mediante qRT-PCR.

RESULTADOS

Cuando comparamos ciclos estimulados frente a ciclos naturales, el transcriptoma de las CC mostró diferencias significativas en la expresión de genes involucrados en la

respuesta inmune, activación celular, diferenciación celular y desarrollo de órganos. De entre los 14 genes diferencialmente expresados, diez de ellos (MYH11, ABCA8, ZNF33B, GIMAP1, ALDH1A2, CTSL2, WDR63, BLM, SOX4, ARHGAP28) estaban infra expresados en ciclos estimulados. De entre el panel de genes, especialmente dos, MYH11 y PF4V1, fueron interesantes por su posible asociación con la regulación de la angiotensina II. Mientras que MYH11 fue infra expresado en los ciclos estimulados, PF4V1 se encontró significativamente sobre expresado.

CONCLUSIÓN

La estimulación ovárica afecta al perfil de expresión génica de las CC. Estudios en diferentes especies de mamíferos, sugieren la presencia un sistema funcional endotelina-angiotensina-peptido natriurético a nivel ovárico involucrado tanto en la maduración ovocitaria como en la ovulación, principalmente a través de su efecto sobre células de la granulosa. La transcripción diferencial de los genes MYH11 y PF4V1 en las CC podría relacionarse con la regulación de la angiotensina II en las propias CC y podría tener un posible papel en los mecanismos desencadenantes de la maduración ovocitaria en humanos.

110: ÉXITO EN LA IAC: LA SUPERVIVENCIA ESPERMÁTICA ES MEJOR INDICADOR QUE EL REM

M. Iglesias¹, I. Galán¹, P. Rollán², L. Melado¹, A. García-Enguïdanos¹, A. Gosálvez^{1,3}.

¹Hospital Universitario Quirón Madrid. ²Universidad Autónoma de Madrid. ³Universidad Europea de Madrid.

e-mail: miriamen1@yahoo.es; miglesias.mad@quiron.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

La supervivencia espermática de las muestras seminales empleadas para inseminación artificial, es un parámetro no bien estudiado. El objetivo de este estudio fue verificar el valor de la supervivencia espermática en la predicción de éxito de la inseminación artificial, en relación a los parámetros clásicos de edad de la mujer y REM.

MATERIAL Y MÉTODOS

Desde enero de 2008 a diciembre de 2010 realizamos 478 inseminaciones en el Hospital Universitario Quirón Madrid (89 gestaciones, 19% tasa de embarazo) y valoramos la supervivencia espermática en 231 casos.

La supervivencia se calculó dividiendo los espermatozoides con movilidad A + B a las 24h de la inseminación entre los espermatozoides con movilidad A + B el día de la inseminación. Para ello, los espermatozoides que permanecen en el residuo del tubo tras la inseminación se diluyeron con medio IVF® (Vitrolife, Göteborg, Suecia) para evitar su deshidratación y se cultivaron a 37°C con 6% de CO₂.

Para determinar si los valores son estadísticamente significativos se realizó la prueba de X².

Registramos también la edad de la mujer el día de la inseminación y el REM inseminado (número total de espermatozoides inseminados).

RESULTADOS

En la Tabla 1, la tasa de gestación fue menor a partir de una cierta edad, y encontramos un claro descenso de la tasa de gestación a partir de los 36 años (80 de 383 (21%) en pacientes de hasta 36a y 9 de 95 (9%) en mayores de 36a, p<0.01).

En la Tabla 2 se observa un aumento de la tasa de embarazo conforme aumenta la supervivencia espermática. Al comparar la tasa de gestación cuando la supervivencia es menor del 50% (8 de 83, 10%) con la obtenida cuando la supervivencia es mayor del 50% (32 de 148, 22%) se observan diferencias claramente significativas (p<0.02).

Tabla 1: Edad de la mujer y tasa de embarazo.

TOTAL	<30a	31-32a	33-34a	35-36a	37-38a	39-40a
89 de 478	13 de 63	18 de 79	25 de 108	24 de 133	6 de 68	3 de 27
19%	21%	23%	23%	18%	9%	11%

Tabla 2: Significación a los 36 años: *(p<0,01).

Edad	Hasta 36 años	Más de 36 años
% Gest	80 de 383 (21%)*	9 de 95 (9%)*

Tabla 3: REM y tasa de embarazo.

REM	>20M	15-19M	10-14M	8-9M	6-7M	4-5M	2-3M	<2M
%Gest	10 de 47	14 de 63	24 de 104	12 de 63	11 de 57	10 de 60	4 de 46	4 de 24
	(21%)	(18%)	(23%)	(19%)	(19%)	(17%)	(9%)	(17%)

Tabla 4: Significación del REM de 4 millones (p=0,09 no significativo).

REM	REM mayor o igual a 4M	REM hasta 3M
%Gest	81 de 408 (20 %)*	8 de 70 (11 %)*

Tabla 5: Supervivencia espermática y gestación.

Supervivencia a las 24h	0-30%	31-50%	51-75%	76-100%
	5 de 43	3 de 40	18 de 86	14 de 62
	12%	(8%)	(21%)	(23%)

Tabla 6: Supervivencia espermática > 50% y su significación *($p < 0,02$).

Supervivencia a las 24h	0-50%	51-100%
	8 de 83	32 de 148
	(10%)*	(22%)*

En la Tabla 3, el descenso en el REM parece relacionarse relativamente con una menor tasa de embarazo. Cuando el REM del día de la inseminación es superior o igual a 4M, quedaron gestantes el 20% (81 de 408) frente a 8 de 70 (11%) con REM menor de 4M ($p=0.15$, no significativo).

CONCLUSIONES

La supervivencia espermática se asocia con claridad al éxito en la inseminación,

con mejor significación que el REM. Sugerimos por ello que sea realizada de rutina en las Unidades de Reproducción Asistida.

La edad femenina por encima de los 36 años establece un pronóstico negativo independiente de los factores seminales.

Queda por definir el valor predictivo de la combinación de dichos factores. En mujeres mayores de 36 años, es posible

que la supervivencia espermática baja sea suficiente para desaconsejar la inseminación aún en presencia de un REM aceptable. Iniciamos por ello un estudio para intentar dilucidarlo.

111: EFECTO DE LA ECLOSIÓN ASISTIDA SOBRE LA TASA DE EMBARAZO EN PACIENTES CON TRANSFERENCIA DE EMBRIONES CONGELADOS

A. Gayo, V. Castañón, I. Arnott, M. Torrents, A. Tamargo, J. Álvarez, D. Díaz, E. Fernández, L. Sánchez
Hospital Universitario Central de Asturias
e-mail: abel_gayo@yahoo.com

INTRODUCCIÓN

Se ha descrito que el *assited hatching*, o eclosión asistida, facilita la implantación en aquellos embriones sometidos a procesos de descongelación debido a la rotura selectiva de la zona pelúcida que se ve endurecida en el proceso de congelación. En aquellos pacientes con gran número de embriones de buena calidad, una vez realizada la transferencia en fresco, el resto son congelados para ser transferidos en ciclos posteriores.

OBJETIVO

Comparar la tasa de embarazo de aquellas pacientes a las que se realizó criotransferencia de embriones sometidos a eclosión asistida con laser

frente a las pacientes que no fueron sometidas a dicha técnica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizan retrospectivamente 60 pacientes que se criopreservaron sus embriones en D+2 o D+3 tras congelación lenta. Después de la descongelación, en un grupo de pacientes (N=20) los embriones son sometidos a tres pulsos de 350 nm de laser (Zylos Laser) y se dejan tres horas hasta su transferencia en incubador a 37 ° C y 6 % CO₂. La tasa de embarazo es comparada con otro grupo de pacientes (N=40) que no fueron sometidos a eclosión asistida. En ambos grupos de pacientes no hay diferencias en cuanto a la edad, al tratamiento de estimulación y a la preparación endometrial (progesterona vaginal). Se

considerará como variable principal la tasa de embarazo bioquímico (beta-hCG)

RESULTADOS

Los pacientes sometidos a eclosión asistida tuvieron una beta-hCG positiva en el 21 % de los casos, comparada con una tasa de 17 % en los pacientes que no se sometieron a dicha técnica.

CONCLUSIONES

Observamos una mayor tasa de embarazo en las pacientes que fueron sometidas a tratamiento de eclosión asistida. Se precisa mayor número de criotransferencias con eclosión asistida para unificar el tamaño muestral y comprobar si las diferencias son estadísticamente significativas.

112: PRESENCIA DE UN SOLO NUCLÉOLO EN PRONÚCLEOS DÍA 1 (PN RATÓN) EN LA COHORTE EMBRIONARIA Y SUS EFECTOS EN CICLOS DE ART EN IVI BARCELONA (2004 - 2010)

Jiménez JP.¹, Teruel J.¹, Florensa M.¹, Martín M.¹, Pellicer A.², Ballesteros A.¹, Calderón G.¹

¹IVI Barcelona, ²IVI Valencia

e-mail: juanpitazo@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La presencia de un único precursor pronucleolar en pronúcleos de día 1 (PN ratón) en embriones humanos es considerada como una anomalía grave, evitándose, en la medida de lo posible, la transferencia de los embriones que presentan esta morfología.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto en el rendimiento reproductivo de la presencia y grado del valor PN ratón en la cohorte embrionaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis retrospectivo de 319 ciclos con al menos 1 embrión de la cohorte en los que se observó un solo nucléolo en pronúcleo de día 1. Los 319 ciclos se dividieron en ciclos de donación y ciclos autólogos que a su vez fueron divididos en otros 3 grupos en función del grado de afección en porcentaje de

presencia de PN Ratón en los embriones de la cohorte. (0% sin presencia PN ratón en ningún embrión de la cohorte y 100% todos los embriones del ciclo presentaban PN ratón) siendo.

i <10% cohorte PN ratón

ii ≥10 > 40% cohorte PN ratón

iii ≥40 cohorte PN ratón

Los resultados se compararon con el resto de ciclos del mismo periodo según su origen ovocitario (donación o autólogo). Las tasas de gestación clínica (TGC), implantación (TI), embarazo gemelar (Tgem) y aborto clínico (AbClin) fueron comparadas estadísticamente usando la prueba de χ^2 (TGC, Tgem y Ab Clin) y test de mann-whitney (edad y TI)

RESULTADOS

Se observan diferencias entre los grupos de donación autólogos, la presencia del

marcador PN ratón en los embriones de la cohorte supone una reducción de la TGC, TI y aumento del aborto en el grupo de autólogos mientras que en el grupo de donación no se evidencian estos efectos negativos.

CONCLUSIONES

La presencia del marcador PN ratón en embriones de la cohorte compromete en gran medida el potencial reproductivo de los mismos, especialmente en ciclos autólogos.

El análisis del grado de afección del marcador PN ratón en la cohorte (Ciclos autólogos) se relaciona con una mayor edad de las pacientes, peor tasa de implantación, menor gestación clínica, así como con una mayor tasa de aborto, sin embargo el mismo parámetro no parece relacionarse de forma negativa en ciclos de donación de ovocitos.

Donación	Control	0 ~100%	i	ii	iii
Casos	3255	180	49	122	8
Edad %	41,16	41,42	41,33	41,74	42,25
% Ratón Cohorte		16,06	8,31	16,58	52,55
TGC %	59,6	62,22	55,1	63,11	62,5
TI %	42,79	45,66	43,75	46,53	35,71
Tgem %	38,75	44,64	44,44	46,75	0
AbClin %	17,7	22,32	33,33	20,78	20
Autólogos	Control	0 ~100%	i	ii	iii
Casos	2358	139	31	89	20
Edad %	36,27	35,9	34,74	35,85	37,9
% Ratón		23,01	8,25	19,19	62,69
TGC %	48,85	42,45	45,16	46,07	20
TI %	34,6	29,89	30,16	32,2	16,13
Tgem %	31,6	37,29	35,71	39,02	25
AbClin %	15,28	16,95	7,14	17,07	50

Tabla resumen resultados. Grupo 0 ~100%: Grupo global que incluye todos los ciclos en los que se encontró al menos un PN ratón en día 1

113: APLICACIÓN DE LAS ESPECIFICACIONES DE CALIDAD ANALÍTICAS AL CÁLCULO DE LOS LÍMITES ADMISIBLES DE ERROR EN PROGRAMAS DE EVALUACIÓN EXTERNA DE LA CALIDAD PARA CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA

E. Palacios, M.C. Gonzalvo, A. Clavero, A. P. Ortiz, S. Carrillo, A. Rosales, B. Romero
Unidad de Reproducción. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada
e-mail: ana.clavero.sspa@juntadeandalucia.es

INTRODUCCIÓN

Una actividad esencial de los laboratorios de andrología es el control de la calidad externo. Para la evaluación de la eficacia de los laboratorios participantes en los Programa de Supervisión Externa de la Calidad (PSEC) se utilizan límites admisibles de error, de manera que el resultado de un laboratorio será considerado aceptable si se encuentra dentro de dichos límites. En este momento los límites admisibles de error dependen, en gran medida, de los criterios de los organizadores del PSEC.

OBJETIVO

Nuestro objetivo es comparar los diferentes criterios descritos en la ISO 13528:2005 para el cálculo de los comentados límites admisibles de error en los PSEC para la concentración espermática.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los datos que se analizarán en este estudio son los valores de la media y desviación típica (DS) obtenidos sobre muestras control independientes, provenientes de dos Programas de Supervisión Externa de la Calidad. Se fijaron cuatro estrategias diferentes de cálculo de los límites admisibles de error según la ISO 13528:2005 (1) basada en los resultados de los laboratorios participantes; (2) basada en los resultados de los laboratorios expertos; (3) utilizando las especificaciones de calidad basadas en la variabilidad biológica, estado del arte y opinión de los clínicos; y (4) utilizando las especificaciones de calidad y ajustando por la incertidumbre del valor asignado.

RESULTADOS

Con la estrategia 1 y 2 se obtienen límites admisibles de error muy amplios. Al contrario, con la estrategia 3, basada solo en las especificaciones de calidad,

se obtienen límites muy estrictos. Sin embargo, con la estrategia 4 obtenemos valores de intervalos de aceptación intermedios en comparación con las demás estrategias. No se observan diferencias en los límites admisibles de error en las estrategias 3 y 4 al variar el modelo empleado para el cálculo de las especificaciones de calidad analítica.

DISCUSIÓN

Los PSEC de concentración espermática, deberían utilizar una estrategia ajustada para la incertidumbre del valor asignado para establecer los límites admisibles de error, ya que con ella se obtienen intervalos de aceptación clínicamente útiles, de manera que los valores incluidos en ellos nos llevan a decisiones clínicamente similares. El definir adecuadamente a los laboratorios expertos es más importante que el modelo escogido para estimar las especificaciones de calidad analítica en un PSEC de concentración espermática.

114: CALIDAD EMBRIONARIA: AGONISTAS VERSUS ANTAGONISTAS DE LA GNRH EN UNA POBLACIÓN DE BUEN PRONÓSTICO

M. A. Vilches-Ferrón(*), M. M. Salas Martínez, J. J. Khouri Choufani, M. A. Torres Rodríguez, M. Pérez-Piaya Moreno, J. Morales Sánchez, G. Fiol Ruiz
Complejo Hospitalario Torrecardenas, Almería
e-mail: mangel.vilches.sspa@juntadeandalucia.es

INTRODUCCIÓN

Desde 2000, la comparación de agonista de la GnRH versus los protocolos de antagonistas de GnRH han sido analizados en distintos estudios clínicos, la mayoría de ellos se centró en la evolución clínica de los dos protocolos, sin embargo, los efectos de los análogos de GnRH en el ovocito

así como en el desarrollo del embrión todavía no se conocen en detalle. El objetivo del estudio fue verificar el impacto del protocolo con antagonistas de la GnRH, en comparación con el protocolo largo de los agonistas de GnRH en el ovocito, en la calidad del embrión y en el desarrollo del embrión en los ciclos de FIV / ICSI.

OBJETIVOS

El objetivo principal es comparar los resultados clínicos y de calidad folicular, obtenidos en ciclos ICSI mediante estimulación ovárica con el tratamiento de antagonista de la GnRH versus el habitual de agonistas de la GnRH mediante protocolo largo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Un estudio clínico randomizado, realizado en la U Reproducción H Torrecárdenas, con pacientes sometidas a inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) durante el período entre Abril 2009 y Abril 2010. Criterios inclusión: 1. Se incluirá en la muestra de estudio mujer entre 18-40 años, con esterilidad primaria, con FSH sérica el día 3º <15 mUI/mL y que vaya a realizar su primer ciclo de reproducción asistida (ICSI). 2. Aceptar la participación en el estudio. Criterios exclusión: no cumplimiento de alguno de los anteriores criterios de inclusión. Al final del estudio se habían incluido 159 pacientes, distinguiendo dos cohortes: 1. 75 pacientes que recibieron protocolo largo de Agonistas de GnRH. 2. 84 pacientes que recibieron protocolo de Antagonistas de GnRH.

RESULTADOS

No encontramos diferencias en el número de ovocitos por punción, ni en metafase II, ni en el porcentaje de fecundados entre pacientes que

recibieron protocolo con agonistas y con antagonistas. Existe un mayor porcentaje de fallo de fecundación total en el grupo que recibió protocolo con antagonistas. Sin embargo, la calidad y el grado de división embrionaria no presentan diferencias entre ambos grupos, y consecuentemente el número de pacientes con transferencia. Al analizar el porcentaje de embarazo entre los dos grupos estudiados observamos que cuando el cálculo se realiza sobre los ciclos con punción o con transferencia embrionaria, la tasa de embarazo del protocolo con antagonistas sigue siendo inferior a la de las pacientes que recibieron protocolo con agonistas, aunque asciende progresivamente. En ningún caso estas diferencias alcanzaron la significación estadística. Tampoco puede apreciarse diferencias significativas respecto a la tasa de implantación embrionaria entre ambos grupos de pacientes. La tasa de múltiple y el porcentaje de los embarazos finalizados en aborto es mayor entre las pacientes que recibieron protocolo con antagonistas sin alcanzar significación estadística.

CONCLUSIONES

1. Los antagonistas de la GnRH son eficaces para prevenir picos de LH y mantienen tasas adecuadas de gestación. 2. Su tolerancia y aceptabilidad es buena, con menos días de estimulación. El periodo total de estimulación es más corto que el de agonistas de la GnRH, lo que hace que el procedimiento sea más fácil de aceptar por las pacientes. 3. Los embriones obtenidos en ambos grupos de similar calidad, tanto en su desarrollo "in vitro" cómo en su capacidad de gestación. 4. El ambiente hormonal de los folículos obtenidos tras DFM mediante protocolo de antagonistas de la GnRH es similar al existente tras protocolo largo de agonistas de la GnRH, no alterándose la calidad ovocitaria y por tanto, la calidad embrionaria. 5. Creemos que es necesario plantear estudios de receptividad endometrial que aclaren si la tendencia a una menor tasa de embarazo en las pacientes que reciben protocolo de antagonistas se debe a una posible influencia negativa del antagonista sobre el endometrio.

115: CULTIVO EMBRIONARIO LARGO Y TRANSFERENCIA EN DÍA+5. ¿A VECES O SIEMPRE?

L. Uroz,^{1,2} A. Fusté,^{1,2} C. Aulesa,² C. Márquez^{1,2}

¹ Gravidia fertilitat avançada, Centre Internacional de Reproducció Humana Assistida de Barcelona. ²Unitat d'esterilitat, Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron

e-mail: afuste@gravidabcn.com

INTRODUCCIÓN

La transferencia de embriones en estadio de blastocisto (día+5) presenta ventajas respecto la transferencia en día+3, ya que permite: (1) conseguir mejores tasas de embarazo e implantación, (2) elegir los embriones con mayor viabilidad para la transferencia, (3) reducir el número de embriones transferidos, (4) una mejor sincronización entre el embrión y el endometrio en el momento de la transferencia y (5),

en casos de diagnóstico genético preimplantacional, mantener los embriones en cultivo hasta la obtención de los resultados del análisis. Actualmente, las mejoras en los medios de cultivo y los avances tecnológicos en los laboratorios de fecundación in vitro (FIV) han aumentado la eficiencia del cultivo largo hasta blastocisto. No obstante, la aplicación de esta técnica en todos los ciclos de FIV conlleva el riesgo de que los embriones no alcancen el estadio de blastocisto en el laboratorio, y por lo tanto no se pueda

realizar la transferencia. En el presente trabajo, hemos prolongado el cultivo hasta blastocisto en aquellos ciclos de FIV/FIV-ICSI que, en día+3, tenían más de tres embriones de buena calidad.

OBJETIVOS

Estudiar si la evaluación embrionaria en día+3 y el número de embriones de buena calidad en día+3 pueden determinar el mejor día para la transferencia embrionaria: día+5 vs. día+3.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo de los ciclos de FIV realizados en el centro *Gravida, fertilitat avançada y Hospital Materno-Infantil de la Vall d'Hebron* desde el 2009 hasta la actualidad. Los ciclos han sido divididos según el día de la transferencia embrionaria: día+3 y día+5. Las variables analizadas han sido: la edad de la paciente, el número de ovocitos obtenidos, el número de embriones transferidos, la tasa de embarazo clínico (presencia de saco gestacional) por ciclo con transferencia y la tasa de implantación.

RESULTADOS

Se realizaron 333 ciclos de FIV o FIV-ICSI, de los que 224 se transfirieron

en día+3 y 109 en día+5. Todas las variables estudiadas mostraron diferencias significativas. Las pacientes a las que se les realizó la transferencia embrionaria en día+5 eran más jóvenes que a las que se les hizo la transferencia en día +3 (34,4 vs 36,4), produjeron un mayor número de ovocitos (9,5 vs 5,9), se les transfirió un menor número de embriones (1,84 vs 1,99), y dieron unas mejores tasas de embarazo clínico (56,9% vs 37,5%) y de implantación (45,1% vs 25,1%).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Coincidiendo con otros estudios, la transferencia embrionaria en día+5 mejoró significativamente las tasas de éxito de los tratamientos de FIV/FIV-ICSI aún transfiriendo un

número significativamente menor de embriones. La tasa de embarazo clínico en día+5 fue de un 56,9%. No obstante, la transferencia en día+3 supuso una buena opción para aquellas pacientes con baja reserva ovárica, añosas o con ciclos no estimulados (ciclos naturales asistidos). En estos casos la tasa de embarazo clínico fue de 37,5%. En conclusión, el criterio de selección entre transferencia a día+5 y día+3 utilizado en este estudio es adecuado. Futuros estudios pueden ayudar a concretar la calidad mínima del embrión para asegurar su viabilidad hasta día+5.

116: EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA Y MORFOLOGÍA EMBRIONARIA EN PACIENTES CON FALLO DE IMPLANTACIÓN RECURRENTE

J. Ten, J. Guerrero, J. Llácer, R. Bernabeu
Instituto Bernabeu, Alicante
e-mail: jten@institutobernabeu.com

INTRODUCCIÓN

Encontrar la causa de los fallos repetidos de la implantación (FRI) embrionaria tras ciclos FIV es quizás uno de los desafíos más retadores que tenemos ante nosotros. Son numerosos los factores implicados e indudablemente la calidad embrionaria es esencial.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es valorar si existen diferencias en cuanto a la cinética y morfología de toda la cohorte embrionaria en pacientes con FRI respecto a pacientes sin FRI.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio retrospectivo en el que se analizan 836 ciclos de FIV/ICSI-TE realizados entre los años 2008 y 2010. Consideramos FRI a aquellas

pacientes que habían realizado al menos 2 ciclos previos con transferencia total de 4 embriones de buena calidad (tipos A y B) sin éxito (grupo de estudio, I), n=94. El grupo control (II) fueron 742 pacientes que realizaron un primer o segundo ciclo con transferencia de embriones de buena calidad. Todas las mujeres de los dos grupos tuvieron <38 años para evitar el sesgo de la edad ligado a alteraciones cromosómicas y se descartó un factor uterino mediante ecografía. Se valoró el número medio de células de toda la cohorte embrionaria en el segundo día de cultivo, así como la calidad embrionaria según los criterios ASEBIR en el día de la transferencia.

RESULTADOS

El número medio de células en el segundo día de cultivo embrionario fue similar en los dos grupos (3.6 en el grupo I y 3.7 en el II, p=0.4). De la misma forma,

no hubieron diferencias significativas entre el grupo I y II respecto al número medio de embriones con calidad A, B, C y D, respectivamente, en el día de la transferencia: A (1.3 vs 1.7, p=0.1), B (1.1 vs 1.2, p=0.4), C (0.9 vs 1.2, p=0.5) y D (1.9 vs 1.8, p=0.6).

CONCLUSIONES

La cinética y morfología embrionaria no se ven afectadas en aquellas pacientes con FRI. Los criterios morfológicos actuales son por tanto incapaces de discriminar aquellos embriones con potencial para implantar en este tipo de pacientes. Otros biomarcadores de receptividad endometrial, metabólicos e incluso del líquido folicular van a ser claves para valorar la competencia embrionaria, así como su correspondiente diálogo endometrial.

117: CRYOPETTE: UNA NUEVA HERRAMIENTA PARA LA VITRIFICACIÓN EN SISTEMA CERRADO

C. Roméu, M. Lierta, J. Sánchez Rubio, A. Chueca, A. Urries
Reproducción Asistida Quirón Zaragoza, Grupo Hospitalario Quirón.
e-mail: cromeu.zar@quiron.es

INTRODUCCIÓN

La criopreservación de gametos y embriones se ha convertido en una tarea rutinaria en los centros de reproducción asistida. Actualmente existen dos técnicas de congelación: la congelación lenta y la vitrificación, con sistemas de almacenaje abiertos o cerrados. En la comunidad científica parece haber discrepancias a la hora de decidir el método de congelación más adecuado para cada caso, pero con respecto al sistema de almacenaje consideramos que el más seguro es el sistema cerrado ya que elimina cualquier riesgo de *cross*-contaminación entre muestras durante su permanencia en el tanque de congelación. Últimamente se ha desarrollado una nueva herramienta para vitrificación en sistema cerrado, Cryopette (Origio, Dinamarca), que pretende mejorar los resultados logrados hasta el momento.

OBJETIVOS

El objetivo del presente estudio fue comparar la eficacia de la vitrificación de embriones multicelulares utilizando Cryopette como soporte de almacenaje, con la de un sistema previamente establecido como es la congelación lenta en pajuelas CBS.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se congelaron un total de 272 embriones en estadio de Día+3 post-punción pertenecientes a 62 ciclos de FIV que aleatoriamente se distribuyeron en 2 grupos según la técnica de congelación empleada: congelación lenta (Sydney IVF Cryopreservation kit ; Cook, Irlanda) versus vitrificación (Medicult Vitrification Cooling kit ; Medicult, Dinamarca). Para el método de congelación lenta los embriones se almacenaron en pajuelas de alta seguridad biológica (CryoBioSystem, Francia) mientras que Cryopette fue el

sistema utilizado para la vitrificación. Ambos son mecanismos de almacenaje cerrados.

La descongelación se llevó a cabo el mismo día de la transferencia o el día previo a ésta. Se consideró que los embriones que habían sobrevivido al proceso eran aquellos que presentaban $\geq 50\%$ de blastómeras intactas o bien tenían tres células viables en el momento de la descongelación, y al menos una de ellas había dividido en las 18h posteriores de incubación. Los ciclos en los que no hubo supervivencia embrionaria fueron cancelados. El embarazo se determinó analizando en sangre los niveles de beta-hCG 14 días después de la transferencia embrionaria.

RESULTADOS

Los datos obtenidos se presentan en la siguiente tabla.

	Congelación Lenta+CBS	Vitrificación+Cryopette
Edad materna	31,4 \pm 5,9	33,1 \pm 5
Nº Ciclos	41	21
Nº Ciclos Cancelados (%)	9 / 41 (22)	7 / 21 (33,3)
Nº embs criopreservados (media)	205 (5)	67 (3,2)
Nº embs descongelados (media)	196 (4,8)	63 (3)
Supervivencia (%)	99 / 196 (50,5)	40 / 63 (63,5)
Nº embs con 100% blastómeras intactas	44 / 99 (44,4)	18 / 40 (45)
Nº embs transferidos (media)	81 (2)	31 (1,5)
Embarazo por ciclo (%)	13 / 41 (31,7)	8 / 21 (38,1)
Embarazo por transferencia (%)	13 / 32 (40,6)	8 / 14 (57,1)

CONCLUSIONES

Según los resultados alcanzados en este estudio se puede concluir que mejoramos las tasas tanto de supervivencia embrionaria como de embarazo mediante la combinación

de la técnica de vitrificación con Cryopette, como sistema de almacenaje cerrado, a pesar incluso de haberse criopreservado un menor número de embriones en los casos en los que se ha realizado vitrificación respecto a los de congelación lenta.

Vitrificación+Cryopette se establece como una herramienta de almacenaje embrionario adecuada y segura ya que al ser un sistema cerrado eliminamos todo riesgo de contaminación cruzada.

118: LA ECLOSIÓN ASISTIDA NO INCREMENTA LOS RESULTADOS EN EMBRIONES DESVITRIFICADOS NI TRAS LA VITRIFICACION DE OVOCITOS

M. Iglesias, I. Galán, P. Rollán, L. Melado, A. García, A. Gosálvez

¹Hospital Universitario Quirón Madrid. ²Universidad Autónoma de Madrid. ³Universidad Europea de Madrid.
e-mail: miriamen1@yahoo.es; miglesias.mad@quiron.es

INTRODUCCIÓN

La eclosión asistida o *assisted hatching* tiene una indicación ya bien establecida en embriones transferidos en día 3 tras la congelación lenta. Sin embargo, su utilidad tras la vitrificación es todavía debatida.

OBJETIVO

Determinar la utilidad de la eclosión asistida en embriones procedentes de la vitrificación tanto de ovocitos

como de embriones, tanto en la tasa de implantación como en la tasa de embarazo evolutivo por transferencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron todos los casos de desvitrificación del Hospital Universitario Quirón Madrid desde Enero de 2010 hasta Febrero de 2011 en los tres posibles casos de desvitrificación: ovocitos de donante, ovocitos propios y embriones. En cada grupo, se analizó la influencia de la eclosión asistida sobre

la tasa de implantación y la tasa de embarazo evolutivo por transferencia.

Todos los casos fueron realizados por la misma embrióloga (M.I.) y la técnica fue homogénea (eclosión asistida de forma mecánica con micropipeta PZD).

Hemos analizado las 95 desvitrificaciones con transferencia de nuestro centro mediante la prueba de chi cuadrado:

TABLA 1: Desvitrificación de ovocitos de donante

Tipo	Pac.	Ov. Desv.	Ov. Sup.	ET	Gestantes	Vesículas	Mujeres fetos en curso
Hatching	11	110	96	22	4	5	2
NO Hatch	18	242	199	35	7	8	7

TABLA 2: Desvitrificación de ovocitos propios

Tipo	Pac.	Ov. Desv.	Ov. Sup.	ET	Gestantes	Vesículas	Mujeres fetos en curso
Hatching	15	132	120	33	5	7	5
NO Hatch	12	96	67	23	4	3	2

TABLA 3: Desvitrificación de embriones

Tipo	Pac.	Ov. Desv.	Ov. Sup.	ET	Gestantes	Vesículas	Mujeres fetos en curso
Hatching	24	62	54	54	11	10	5
NO Hatch	15	40	35	35	5	4	3

RESULTADOS

En los grupos de desvitrificación de ovocitos, la eclosión asistida no mejoró la tasa de embarazo (4/11 36% frente a 7/18 39% en ovocitos de donante y 5/15 33% frente a 4/12 33% en ovocitos propios), ni la tasa de implantación (5/22 23% frente a 8/35 23% en ovocitos de donante y 7/33 21% frente a 3/23 13% en ovocitos propios). Las tasas de gestación evolutiva fueron también similares (2/11 18% frente a 7/18 39% y 5/15 34% frente a 2/12 17% respectivamente).

En el grupo de embriones desvitrificados tampoco encontramos diferencias significativas a favor de la eclosión asistida (11/24 46% frente a 5/15 33% en la tasa de embarazo, 10/54 19% frente a 4/35 11% en la tasa de implantación y 5/24 21% frente a 3/15 20% en la tasa de gestación evolutiva por transferencia).

CONCLUSIONES

Aunque el tamaño de la muestra no permite establecer conclusiones definitivas, la eclosión asistida no

parece incrementar la probabilidad de embarazo cuando se realiza en embriones procedentes de ovocitos desvitrificados, tanto si son ovocitos de donante como propios, ni cuando empleamos la técnica en embriones desvitrificados.

Por ello, consideramos que es necesario recopilar más datos para llegar a una conclusión más determinante.

119: LA MUSICOTERAPIA REDUCE EL ESTADO DE ANSIEDAD EN UN PROGRAMA DE FECUNDACIÓN IN VITRO (FIV)

O. López¹, A. García¹, O. Martínez-Pasarell¹, A. Mata¹, I. Martínez², K. Díaz², F. Mas², N. Camps³, E. Clot⁴, P. Parés⁵, J. Goyanes², L. Bassas¹.

¹Laboratorio de Embriología y Seminología, ²Servicio de Enfermería, ³Servicio de Psicología Clínica, Fundació Puigvert, Barcelona. ⁴Laboratori Clínic IDI-BELL, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona. ⁵Equipo de Ginecología; Programa de Reproducción Asistida, Fundació Puigvert-HSCSP, Barcelona. e-mail: olopez@fundacio-puigvert.es

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de reproducción asistida ocasionan en las pacientes malestar físico y psíquico. La transferencia embrionaria es la última intervención del proceso, donde toda la ansiedad acumulada se manifiesta de nuevo. La musicoterapia es una técnica aplicada en diversos campos de la medicina para disminuir la ansiedad en los pacientes, y que facilita la relajación psicofísica de un modo sencillo.

OBJETIVO

El objetivo principal ha sido determinar el efecto de la música en las tasas de gestación de un programa de fecundación in vitro (FIV). Como objetivos secundarios, se ha procedido a evaluar los efectos psicológicos y fisiológicos de la música, así como la satisfacción personal de las pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un ensayo clínico prospectivo, abierto, controlado y aleatorizado en dos grupos de estudio, control (C) y musicoterapia (M). Todas las pacientes firmaron consentimiento informado.

Durante el periodo comprendido entre diciembre 2010 hasta abril de 2011 se reclutaron 216 pacientes (n=112 grupo C y n=104 grupo M), todas ellas con transferencia embrionaria (TE) en día 2 como criterio principal de inclusión. Los efectos psicológicos de la música se evaluaron mediante el test STAI (estado-rasgo) y los efectos fisiológicos mediante la medición de la frecuencia cardíaca y tensión arterial. El día de la punción folicular (PF), las pacientes incluidas en el grupo M, recibieron un CD (*Vol II Music for Rest & Relaxation, Mozart*) junto con instrucciones para su audición periódica en condiciones de reposo físico hasta el día de la TE, momento en el cual, cumplimentaron un cuestionario de satisfacción personal sobre la experiencia. Durante la TE, se continuó la audición musical en el quirófano y se mantuvo durante las dos horas de reposo posteriores. En ambos grupos se determinó la frecuencia cardíaca y la tensión arterial (TA) a los 0, 30 y 90 minutos post transferencia y se realizó el test de STAI.

Se comprobó la homogeneidad de los grupos de estudio mediante los parámetros edad, intentos previos de fecundación, nº oocitos, nº de oocitos en metafase II y

nº y calidad de los embriones (obtenidos y transferidos). El test estadístico *t* de Student se empleó para variables que seguían distribución de Laplace-Gauss y la prueba *U* de Mann-Whitney para variables que no seguían dicha distribución.

RESULTADOS

No se encontraron diferencias significativas en la tasa de gestación entre ambos grupos (45,5% y 45,2% , C y M respectivamente). El valor para el test STAI (estado) fue significativamente más bajo en el grupo M vs grupo C (10,3 vs 13,9; $p < 0.001$). El decremento medio de la TA diastólica a los 90 min en el grupo de pacientes que recibieron musicoterapia respecto al grupo control fue significativamente mayor 13,9 vs 10,5 mmHg ($p < 0.05$). En el resto de parámetros no se encontraron diferencias entre los dos grupos. El cuestionario de satisfacción personal reflejó que un 84,6 % de las pacientes, manifestaban haberse sentido bastante o muy relajadas durante los dos días previos a la TE. Un 91,3% de las pacientes "repetirían la experiencia" y un 86,5% manifestaron su aprobación con respecto a la música seleccionada.

CONCLUSIONES

Aunque las tasas de gestación fueron similares entre los dos grupos, la musicoterapia produjo una reducción apreciable en indicadores de estrés

psicológico y fisiológico en las pacientes que recibieron dicha terapia. Las pacientes expuestas a la música apreciaron una mejora en la calidad asistencial y humana percibida. Ello sugiere que la musicoterapia puede ser utilizada como

ayuda para afrontar el estado de ansiedad inherente a los procesos de reproducción asistida. Sería interesante ampliar el estudio aumentando la duración del tratamiento.

120: ACCESIBILIDAD A LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN PACIENTES CON INFECCIONES VIRALES CRÓNICAS

I. Molina, A. Clavero, B. González, ER. Palacios, S. Carrillo, L. Martínez, MA. Calderón.

Unidad de reproducción, Hospital Universitario Virgen de las Nieves

e-mail: imoglez@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Hasta la fecha son muchos los trabajos que han descrito la seguridad de la técnica de lavado de semen-ICSI para parejas serodiscordantes para VIH, VHC y VHB. Diferentes autores han puesto también en evidencia la escasa oferta de centros que ponen las ART a disposición de los pacientes con enfermedades infecciosas transmisibles (EIT), sin embargo ningún estudio ha analizado la accesibilidad de las parejas a este tipo de técnicas.

OBJETIVOS

Analizar la accesibilidad a las TRA en Andalucía para parejas serodiscordantes con varón positivo para EIT, así como los posibles factores que influyen en ella, como la inmigración o la distancia del lugar de residencia al centro de reproducción.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se llevaron a cabo estimaciones de la demanda teórica de ciclos de ART que deberían haberse realizado en parejas con varón infectado con EIT en nuestro

Hospital público de referencia, una a partir de la población general y otra a partir de la población subfétil.

Se tuvieron en cuenta el número de parejas en edad reproductiva, el número de parejas subfétils, la prevalencia de estas infecciones, los deseos reproductivos de estas parejas, así como el número máximo de dos ciclos que se realiza a una pareja en el sistema sanitario público de Andalucía.

RESULTADOS

Como era de esperar la demanda teórica estimada de ciclos de ART por año en varones con EIT fue mucho mayor a partir de datos de población general que de parejas subfétils, pues en la primera situación se incluye además de a las parejas subfétils, a las parejas fétils con esterilidad voluntaria. Al comparar estos valores con el número de ciclos realizados, observamos que en el caso de HIV, se realizó aproximadamente una quinta parte de la estimada para la población general y la mitad de lo estimado para parejas infértiles. Sin embargo, los ciclos realizados en parejas con hepatitis representan una pequeña parte de

los ciclos estimados a partir de la población general y aproximadamente la quinta parte de lo estimado para parejas subfétils. El porcentaje de varones inmigrantes con EIT atendidos en nuestra unidad es similar a la prevalencia de estas enfermedades en la población inmigrante. No se encontraron diferencias significativas en el número de ciclos realizados a pacientes que residían a gran distancia de nuestro centro (> 200 km), respecto a los pacientes que residían cerca, tanto para HIV como para hepatitis.

CONCLUSIONES

No creemos que exista un problema específico de accesibilidad a estas técnicas en estas parejas, aunque el número de ciclos realizados sea menor a la demanda esperada tanto al estimarla a partir de la población general como de la población subfétil. La ratio es la misma que la observada para pacientes sin EIT entre centros públicos (20%) y privados (80%) en España. La demanda no atendida en el sistema público de salud, suponemos que es atendida en el sistema privado, al igual que ocurre en las parejas sin EIT.

121: LA INFLUENCIA DEL CULTIVO A BAJAS CONCENTRACIONES DE OXÍGENO MEJORA EL DESARROLLO E IMPLANTACIÓN DE LOS BLASTOCISTOS

Y. Franco, M.J. Lázaro, P. Rodríguez, E. Ortiz, M. García
Centro Sanitario Virgen del Pilar
e-mail: josufranco@hotmail.es

INTRODUCCIÓN

El cultivo hasta el estadio de blastocisto nos permite realizar una mejor evaluación de la calidad embrionaria y una mejor selección de embriones para transferir. Esto permite la realización de transferencias de embrión único, logrando así una disminución en la tasa de embarazo múltiple.

El uso de los nuevos sistemas de cultivo embrionario como son los medios secuenciales y los incubadores con baja concentración de oxígeno muestran un incremento significativo en la tasa de implantación transfiriendo embriones en D+5 vs D+3. Estudios prospectivos han demostrado que la tasa de implantación por blastocisto es de un 50,5% mientras que la tasa de implantación por embrión de día 3 es de un 30,1%

Las condiciones de cultivo embrionario tradicionales son de un 5% de CO₂, 20% de O₂ y el resto N₂. Este porcentaje de oxígeno puede promover la generación de especies reactivas de oxígeno, que puede provocar una disminución en el número de embriones que llegan al estadio de blastocisto.

Los estudios realizados en modelos animales muestran que las condiciones fisiológicas encontradas en los oviductos tienen un rango del 5-8,7% de O₂, mientras que en el útero se encuentran en torno al 2%. Por este motivo se ha observado un efecto favorable del cultivo con baja concentración de O₂ especialmente en el estadio de blastocisto.

OBJETIVOS

Evaluar la eficiencia y beneficios del cultivo de blastocistos en condiciones de baja concentración de O₂.

MÉTODOS

En nuestro laboratorio de embriología hemos implementado desde febrero de 2010 el cultivo de blastocistos a baja concentración de oxígeno (5% O₂) utilizando para ello el mini-incubador K-MINC 1000 (Cook).

De los ciclos realizados durante este periodo hemos obtenido en 55 ciclos una calidad óptima de blastocistos en D+5 y D+6, en los cuales fueron vitrificados 96 blastocistos utilizando

para ello el soporte Cryotop y los medios Irvine Scientific.

RESULTADOS

Hasta el momento se han realizado 23 casos de desvitrificación, descongelándose un total de 35 blastocistos, con una tasa de supervivencia del 74%. De estas 23 desvitrificaciones se realizaron 17 criotransferencias obteniéndose una tasa de implantación de un 46% con una tasa de embarazo por transferencia de un 53%.

CONCLUSIONES

El cultivo de blastocistos a baja concentración de O₂ permite obtener una mejor tasa de desarrollo de blastocisto y una mejor calidad, lo que se traduce en un mayor número de blastocistos vitrificados. Nuestros resultados hasta el momento avalan los estudios publicados por otros autores obteniendo en nuestro centro una mayor tasa de implantación y de embarazo por ciclo de desvitrificación de blastocistos.

122: RELACIÓN ENTRE EL TIPO DE ROTURA SIN SALTO Y LA TASA DE OVOCITOS DEGENERADOS

C. Muñoz, A. Sáez, C. Olmedo, J. L. Soriano, I. Cuevas
Hospital General Universitario de Valencia
e-mail: konxi21@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de fecundación asistida se han convertido en un tratamiento de uso común para los diferentes tipos de infertilidad, tanto la de origen desconocido como la de factor masculino y femenino. En la bibliografía consultada

hemos observado que la tasa de ovocitos degenerados tras la microinyección oscila entre un 8 y un 10%.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio es establecer la posible relación entre el tipo de rotura

del citoplasma ovocitario durante la microinyección y la tasa de ovocitos degenerados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recopilaron los datos de un total de 495 ovocitos microinyectados de forma

consecutiva de 72 pacientes sometidas a tratamientos de fecundación in vitro (ICSI) en la Unidad de Reproducción Humana Asistida del Hospital General Universitario durante el período comprendido entre abril de 2009 y febrero de 2010.

Durante el procedimiento de microinyección se fueron registrando los distintos tipos de rotura de la membrana ovocitaria clasificando de la siguiente forma: con salto y sin salto. Posteriormente se evaluó la fecundación, anotando los ovocitos que habían degenerado y los que no.

Los datos obtenidos se analizaron mediante el test chi-cuadrado con la corrección

exacta de Fisher's usando el programa estadístico SPSS 11.0. Para evitar sesgos debidos a la obtención consecutiva de los datos se aleatorizó la muestra.

RESULTADOS

La muestra obtenida en la aleatorización fue de 244 ovocitos. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la tasa de degeneración de ovocitos que presentaban salto (8,3%) y la de los que no lo presentaban (35,7%). La chi-cuadrado obtenida fue de 0.001 y la O.R. fue de 6,1 con un intervalo de confianza al 95% [1,6 – 20,0].

CONCLUSIONES

Tras realizar este estudio observamos que cuando la rotura de la membrana se produce sin salto durante la microinyección la probabilidad de que el ovocito degenera es 6 veces mayor. En nuestro laboratorio hemos observado que los ovocitos obtenidos de folículos ecográficamente post-maduros (>22 mm.) presentan una mayor frecuencia de rotura de membrana sin salto, por lo que la programación de las punciones en el momento adecuado es importante para los resultados del laboratorio.

123: PARÁMETROS SEMINALES EN VARONES CON VIH SEGÚN EL MANUAL DE LA OMS

I. Molina, MC. Gonzalvo, JA. Castilla, B. González, ER. Palacios, AP. Ortiz, S. Carrillo
Unidad de reproducción, Hospital Universitario Virgen de las Nieves
e-mail: imoglez@gmail.com

INTRODUCCIÓN

El estudio del semen permite conocer el estado funcional de la secreción exocrina de las glándulas sexuales masculinas y nos orienta sobre patologías del sistema genital. En pacientes con VIH el análisis de semen suele solicitarse dentro de la práctica clínica derivada del empleo de las diferentes técnicas de reproducción asistida, encaminadas fundamentalmente a evitar la transmisión horizontal y vertical.

OBJETIVOS

El objetivo de este estudio fue comparar los parámetros básicos del semen de individuos infectados por VIH con los valores de referencia del eyaculado según manual OMS-99 de análisis de semen.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo observacional de 33 pacientes infectados por VIH, que

consultan con su respectiva pareja en la Unidad de Reproducción de nuestro hospital, por deseos reproductivos. En todos los casos la carga viral para VIH-1 de los pacientes fue inferior a 40 copias/ml. Además, 23 de los pacientes, presentaron coinfección por virus de la hepatitis C, siendo en todos los casos la carga viral para el VHC menor de 15 UI/ml. A todos ellos, se les realizó un análisis básico del semen, determinando, entre otros parámetros, la concentración, volumen, número de espermatozoides y movilidad de los mismos. Los seminogramas fueron realizados en el periodo comprendido entre 2005-2009.

RESULTADOS

El análisis estadístico de los parámetros seminales, anteriormente citados, muestran los siguientes valores medios:

Volumen: 3.2 ml

Concentración:
58.453.125 espermatozoides/ml

Número total de espermatozoides:
170.714.516 espermatozoides

Movilidad total: 46.5%

Movilidad (a + b): 30.8%

CONCLUSIONES

Todos los pacientes con VIH que acuden a nuestro centro con deseos reproductivos, presentan un volumen, concentración espermática y número de espermatozoides superior a los valores de referencia del manual de la OMS-99 de análisis de semen. Sin embargo, la movilidad espermática (tipo a+b) presentó un valor medio (30.8%) inferior al valor de referencia publicado en el manual OMS-99 de análisis de semen ($\geq 50\%$ de los espermatozoides con motilidad tipo a + tipo b).

124: EL pH DEL MEDIO DE CULTIVO DETERMINA EL CO₂ ADECUADO DEL INCUBADOR

C. Bou, D. Agudo, J. Alonso, A. Martínez, F. Bronet
IVI Madrid
e-mail: carmen.bou@ivi.es

INTRODUCCIÓN

Uno de los factores que afecta a los resultados gestacionales es el medio de cultivo embrionario que se utiliza en el laboratorio de Reproducción Asistida. Las características físico-químicas del medio, pH, temperatura, osmolaridad así como la concentración de O₂ y CO₂ influyen en la viabilidad y desarrollo de los embriones.

OBJETIVOS

Optimizar las condiciones de cultivo embrionario ajustando el porcentaje de CO₂ del interior de los incubadores según el valor recomendado de pH del medio de cultivo, y determinando el tiempo óptimo de equilibrio de las placas de cultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Utilizamos el pHmetro *on line* MTG que permite monitorizar de forma continua los valores de pH en intervalos de tiempo establecidos. El sensor de pH está integrado en una placa que contiene 200 microlitros de medio de cultivo Global (LifeGlobal) suplementado con HSA y cubierto de aceite mineral. El pH recomendado por el fabricante es 7.20±0.1. Registramos los pH cada 10 minutos durante 24 horas en incubadores con diferentes concentraciones de CO₂: 7%, 6.5% y 5.8%

RESULTADOS

Cuando el incubador tiene un 7% de CO₂, el promedio de pH del medio es 7,17 alcanzándose el equilibrio a las 4 horas 30 minutos aproximadamente. Cuando tiene un 6,5% de CO₂, el pH es 7,20 y

necesita un mínimo de 4 horas para equilibrarse. En el incubador con 5,8% el pH es 7,31 y el tiempo de equilibrio es de 2 horas. Según estos resultados, el pH óptimo del medio que empleamos en nuestro laboratorio se alcanza cuando el incubador tiene un 6,5% de CO₂.

CONCLUSIONES

Muchos procesos metabólicos, síntesis de proteínas, función mitocondrial y regulación del citoesqueleto, son sensibles a variaciones de pH. Este factor también puede influir en la calidad embrionaria y depende de la formulación del medio de cultivo. Con el objetivo de minimizar el estrés intracelular del embrión consideramos importante controlar el pH del medio de cultivo embrionario para ajustar el CO₂ de los incubadores, y utilizar el medio una vez alcanzado el equilibrio.

125: CORRELACIÓN ENTRE MORFOLOGÍA EMBRIONARIA Y GENÉTICA

B. Hurtado de Mendoza, J. Arbúes, T. Muñoz, I. García, C. Romero
Instituto Ginecológico "La Cigüeña". Madrid
e-mail: cromero@laciguenia.com

INTRODUCCIÓN

Los centros de Reproducción Humana han ido incorporando de forma progresiva el Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) en casos de edad avanzada, fallo repetido de implantación y abortadoras habituales. Se han publicado estudios haciendo referencia a la escasa o nula utilidad de esta técnica por no aumentar la tasa de gestación. Sin embargo, consideramos que la evaluación de distintas características morfológicas de los embriones durante su cultivo *in vitro* son insuficientes para seleccionar aquellos embriones con mayor

potencial de implantación y así lograr una gestación evolutiva que diera lugar a un recién nacido sano.

Presentamos un caso clínico de estudio de DGP donde una adecuada morfología embrionaria coincide con embriones cromosómicamente alterados.

OBJETIVO

Demostrar que una apropiada morfología del embrión para su selección y posterior transferencia no corresponde siempre con los resultados genéticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Documentamos un caso estudiado de una mujer de 38 años a la que se le practica un ciclo de FIV-ICSI con DGP por abortadora habitual. Se realizó estimulación ovárica folicular controlada con FSHr a una dosis diaria de 225 UI durante 11 días. Punción folicular a las 36 horas de aplicar hCGr 250mcg/ml (Ovitrelle). Se obtuvieron 21 ovocitos, 18 de los cuales se encontraban en Metafase II. Se microinyectaron con semen conyugal fresco y se observaron signos de fecundación en 14 cigotos, a las 18 h. post ICSI. Se realizó FISH para los cromosomas 13, 15, 16, 17, 18, 21,

22, X e Y. Durante el cultivo in vitro, los embriones fueron fotografiados cada 24 horas mediante cámara digital acoplada al microscopio invertido, desde el estadio de cigoto hasta el de blastocisto.

RESULTADOS

De los 14 embriones analizados 2 de ellos se detuvieron post biopsia embrionaria y los 12 restantes se desarrollaron hasta el estadio de blastocito y eclosionaron espontáneamente. El estudio FISH

reveló información para 13 embriones, uno no fue informativo. De los 13 embriones solo 1 presentó normalidad cromosómica para todas las sondas estudiadas, y los otros 12 presentaron cromosomopatías para los cromosomas testados. (Tabla 1)

CONCLUSIONES

1. La información que aporta la morfología de los embriones es insuficiente para su correcta selección.

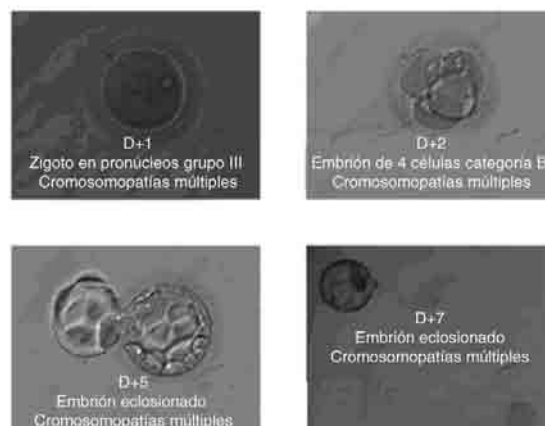
2. El DGP demuestra que una adecuada morfología y evolución embrionaria no siempre se corresponde con un embrión cromosómicamente normal.

3. Profundizar en nuevos estudios y añadir a los criterios de selección embrionaria parámetros bioquímicos relacionados con el metabolismo del embrión es un reto y aportaría datos objetivos para transferir aquellos embriones con mayor probabilidad de conseguir un recién nacido sano en casa.

EMB	Núcleo	13	15	16	17	18	21	22	XY	T18p	T21q	Diagnóstico
1	1	2	2	1	2	2	3	3	XY	-	-	Cromosomopatías múltiples
2	1	2	2	2	2	2	N.I.	2	XX	-	1	Monosomía 21
3	1	2	2	N.I.	2	2	3	2	XY	-	-	Trisomía 21
4	1	2	2	N.I.	2	2	2	1	XX	-	-	Monosomía 22
5	1	2	3	1	2	2	2	3	XXY	-	-	Cromosomopatías múltiples
6	1	2	2	2	2	2	N.I.	2	XX	-	2	Normal
7	1	2	2	2	2	2	2	2	X	-	-	Monosomía X
8	1	2	1	1	2	2	2	1	XY	-	-	Cromosomopatías múltiples
9	1	2	2	2	2	N.I.	2	2	XX	3	-	Trisomía 18
10	1	4	3	4	4	3	4	4	XXYY	-	-	Poliploide
11	1	1	1	1	1	1	1	1	X	-	-	Haploide
12	1	2	2	2	2	3	2	2	XX	-	-	Trisomía 18
13	1	2	2	1	2	2	3	1	XY	-	-	Cromosomopatías múltiples
14	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sin diagnóstico

Tabla 1. Análisis de los resultados de FISH. (N.I. Hibridación no informativa)

Evolución de embrión a blastocito presentando cromosomopatías múltiples



126: IDENTIFICACIÓN DE FACTORES BIOLÓGICOS, SOCIALES Y GEOGRÁFICOS DE POSIBLE INFLUENCIA SOBRE LA CALIDAD SEMINAL

J. Valero, P.J. Fernández, I. Molina, A. Pellicer.
Unidad De Reproducción Humana Asistida. Hospital Universitario La Fe, Valencia
e-mail: jefreevalero@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios han analizado la posible influencia de los hábitos de vida y factores sociales, demográficos o geográficos sobre la calidad seminal; siendo los resultados casi siempre controvertidos. Otros autores han sugerido que en los últimos 50 años se ha producido un deterioro evidente de la calidad seminal.

OBJETIVOS

En este contexto se plantea:

Determinar la posible relación entre la calidad seminal, hábitos de vida y factor geográfico mediante un estudio prospectivo.

Evaluar, retrospectivamente, los cambios en la calidad seminal durante los últimos 20 años.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el estudio prospectivo fueron incluidos 464 varones que acudieron a la Unidad de Reproducción Humana Asistida del Hospital Universitario La Fe de Valencia para ser diagnosticados y tratados. A cada varón se le realizó un espermiograma básico (recuento y motilidad en fresco y tras *swim-up*, viabilidad, estudio inmunológico y progresión) y rellenó un cuestionario que recogía su situación personal (con o sin pareja estable), salud (procesos febriles, consumo de fármacos e intervenciones previas), hábitos de vida

(consumo de café, tabaco y alcohol) y origen geográfico.

En el estudio retrospectivo fueron incluidos 2460 varones a los que se realizó un espermiograma en la misma Unidad, entre 1990 y 2010.

Para los seminogramas se utilizaron los valores de referencia establecidos por la OMS en sus manuales de 1999 y 2010. Los datos fueron analizados con el programa estadístico SPSS mediante pruebas de análisis multivariante y curvas de regresión lineal.

RESULTADOS

Los resultados muestran que el consumo de café, alcohol y tabaco no afecta significativamente a la calidad seminal de los varones estudiados. Sin embargo, intervenciones quirúrgicas previas (o traumatismos recientes) sí que afectaron de forma significativa ($p<0,01$) al recuento en fresco (36 millones/ml vs. 42 millones/ml).

Por otro lado, los varones con pareja estable presentaron un recuento en fresco significativamente mayor ($p<0,05$) que varones sin pareja estable (40 millones/ml vs. 27 millones/ml; $p<0,01$). De igual modo, la población activa mostró un mejor recuento en fresco (48 millones/ml vs. 37 millones/ml; $p<0,01$) que los varones en paro ($p<0,05$).

Al estudiar el factor geográfico se observa que el recuento espermático en fresco de

varones españoles es significativamente superior ($p<0,05$) al de los varones del norte de África (42 millones/ml vs. 27 millones/ml; $p<0,01$); mientras que dicho recuento es significativamente inferior al de varones procedentes de otros países de Europa Occidental (Italia, Francia, Reino Unido, Holanda, etc.) (42 millones/ml vs. 51 millones/ml; $p<0,01$) y de América (42 millones/ml vs. 49 millones/ml; $p<0,01$).

El estudio retrospectivo sólo muestra un descenso significativo ($p<0,01$) en la motilidad tipo "a" (14% vs. 28%) y en la progresión espermática (20 mm vs. 16 mm).

CONCLUSIONES

El consumo de café, tabaco y alcohol, independientemente de las cantidades consumidas, no parece afectar a la calidad seminal de los varones.

Tan sólo se observa deterioro en la calidad seminal en varones que han sufrido algún traumatismo previo o intervención en los seis meses previos al espermiograma. También, se observa que los varones con pareja estable presentan una mejor calidad seminal que los que no la tienen. El factor geográfico revela que la calidad seminal de los españoles es superior a la de los africanos, pero peor que la de otros países europeos así como de varones del continente americano. Finalmente, el estudio retrospectivo revela, en los últimos 20 años y en la población estudiada, un descenso en la motilidad progresiva tipo "a" y progresión espermática.

127: TRANSFERENCIA EMBRIONARIA ELECTIVA: SEGURIDAD Y CALIDAD EN RAH

M. A. Vilches-Ferrón (*), M.C. Velázquez de Castro del Pino., E. Sánchez Fornieles, A. Montilla Gómez, J. J. Khouri Choufani., C. Arqueros Gutiérrez, M. M. Nicolás Martínez
Complejo Hospitalario Torrecárdenas, Almería
e-mail: mangel.vilches.sspa@juntadeandalucia.es

INTRODUCCIÓN

Establecer en el H Torrecárdenas una política de transferencias electivas de 1/2 preembriones (eSET) que permitiera reducir los embarazos gemelares sin disminuir la probabilidad de embarazo. Para determinar el grupo de pacientes a los que se ofrecería eSET, nos basamos en el estudio previo de nuestros datos con el que establecimos las condiciones para la transferencia de 2 embriones en cuanto a edad y calidad embrionaria.

OBJETIVOS

Analizar los resultados de la transferencia de < 3 embriones y su impacto en la tasa de embarazo y la tasa de multigestación, para adoptar nuevas políticas en cuanto al número de embriones transferidos y contribuir a la solución de una importante complicación de las técnicas de Reproducción Asistida: el embarazo múltiple.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los datos analizados en este trabajo se han obtenido de ciclos FIV/ICSI realizados en nuestro centro (marzo 2009 a marzo 2010). En este periodo se realizan 220 transferencias a mujeres con edad <36 años en 1º o 2º ciclo, de las que 180 tenían al menos un embrión

óptimo el día de la transferencia, y 47 transferencias de 36 a 38 años en su primer ciclo FIV/ICSI, de las que 41 tenían al menos un embrión óptimo. En el grupo de mujeres < 36 años en 1º o 2º ciclo, 61 TE de 1 embrión y 128 de 2 embriones. En el grupo de 36 a 38 años en 1º ciclo, 16 transferencias de 1 embrión y 8 de 2 embriones. Se analizaron en cada tipo de transferencia la tasa de embarazo (TE), tasa de implantación (TI), tasa de embarazos gemelares (T Gem), tasa de aborto (TA), y tasa de embarazo conseguida en FIV más la conseguida con los embriones congelados del mismo ciclo (eSET+CT o DET+CT). Para calcular esta última variable se han tenido en cuenta sólo el primer embarazo por cada ciclo de FIV. Los estadísticos se hicieron aplicando los test X^2 y prueba t para medias de dos muestras.

RESULTADOS

En el grupo de mujeres 36 a 38 años los factores de esterilidad se distribuyen de manera semejante entre las pacientes que optan por eSET (transferencia embrionaria de 1 solo preembrión) o DET (transferencia embrionaria de 2 preembriones), sin diferencias estadísticamente significativas. En el grupo de mujeres de menor o igual a 36 años, en el caso del factor masculino se puede asegurar que no hay diferencias significativas entre las pacientes que

hacen eSET o DET. En los demás factores si existe diferencias significativas ($p < 0.05$). Las tasas de embarazo de eSET (30,6%) y DET (34,7%) sin diferencias ($p > 0.05$). Las tasas de aborto tras eSET (18,2%) y DET (19,2%) sin diferencias significativas ($p > 0.05$). Tampoco hay diferencias entre las tasas de embarazo conseguidas con eSET+CT (30,6%) y DET (34,7%) ($p > 0.05$), o entre eSET+CT (30,6%) y DET+CT (37,3%) ($p > 0.05$). En cuanto a la respuesta a la estimulación ovárica (Nº de MII) y al resultado en el laboratorio (Nº MII inseminados, Nº embriones, Nº embriones óptimos) las pacientes en cualquier grupo de edad, que optan por eSET o DET, presentan diferencias estadísticamente significativas.

CONCLUSIONES

En mujeres de 36 o menos años, cuando hay un embrión de calidad óptima, la tasa de embarazo de eSET es inferior a la tasa de DET. En este grupo casi el 10% (7,7%) de los embarazos obtenidos por DET son gemelares. Sin embargo este valor es incluso algo mejor al 10% recomendado por la ESHRE. No obstante puede mejorarse estos resultados si se complementa el eSET con posteriores criotransferencias derivadas del mismo ciclo de FIV. Por tanto, para establecer el eSET es necesario tener un buen programa de crioconservación.

128: NIVELES SÉRICOS ELEVADOS DE PROGESTERONA DURANTE LA ESTIMULACIÓN EN CASOS DE OVODONACIÓN NO AFECTAN A LAS TASAS DE GESTACIÓN, ABORTO E IMPLANTACIÓN

M. Ojeda, J. Aguilar, M. Mollá, E. Táboas, E. Muñoz
IVI Vigo
e-mail: maria.ojeda@ivi.es

INTRODUCCIÓN

En la bibliografía existe controversia en cómo pueden afectar los niveles elevados de progesterona sérica en las tasas de gestación, aborto e implantación y en la calidad embrionaria. En los casos de ovocitos propios puede afectar a la implantación del embrión debido a una luteinización prematura.

El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto de niveles elevados de progesterona en la estimulación ovárica de donantes de ovocitos sobre las tasas de gestación (TG), aborto (TA) e implantación (TI) en las receptoras del programa de ovodonación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo de 46 ciclos de ovodonación en los que las donantes presentan niveles de progesterona sérica entre 2,5 y 4 ng/ml en algún momento de la estimulación (2005-2010). La estimulación ovárica de las donantes se realizó con antagonistas, dosis diaria. Las receptoras fueron preparadas según describe nuestro protocolo con un depósito de agonista GnRH y valerianato de estradiol en dosis

progresiva.

RESULTADOS

La tasa de cancelación de transferencias fue 21,7% (10/46), la TG por transferencia embrionaria 55,55% (20/36), la TA por transferencia 15% (3/20) y la TI 40% (26/65), mientras que las obtenidas en nuestro centro en receptoras del programa de donación de ovocitos son una tasa de cancelación de 9,08%, una TG de 62,29%, una TA de 16,29% y una TI de 43,68%.

Según se haya realizado la transferencia en día 3 de vida embrionaria o en día 5-6, la TG fue de 25% (4/16) frente 75% (15/20), la TA de 25% (1/4) frente 13,33% (2/15) y la TI de 17,85% (5/28) frente 56,75% (21/37), respectivamente. En 8 de los 20 casos en los que se realizó la transferencia en día 5-6 de vida, los embriones presentaban elevada tasa de fragmentación en día 2 y 3.

En 7 casos las muestras seminales eran de baja calidad y resultaron en 1 aborto clínico, 2 no gestaciones, 2 casos sin transferencia embrionaria y 2 gestaciones clínicas evolutivas con recién nacido vivo sano.

CONCLUSIONES

En el grupo de pacientes estudiado no existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las TG, TA y TI respecto a las obtenidas en nuestro centro en el programa de ovodonación, aunque la tasa de cancelación de transferencias es más elevada por lo que podemos considerar que son ciclos de peor pronóstico.

Elevados niveles séricos de progesterona durante la estimulación podrían afectar a la calidad embrionaria en casos de ovodonación aunque deberíamos considerar el efecto negativo que pueden ejercer las muestras seminales de baja calidad. En aquellos casos de cohortes embrionarias de calidad subóptima, el cultivo prolongado de los embriones a día 5-6 parece una buena estrategia para optimizar los resultados clínicos.

Estudios prospectivos y con mayor tamaño de muestras serían necesarios para confirmar estos datos.

129: RELACIÓN DEL IMC CON LA CALIDAD SEMINAL

E. Garjjo; F. Guijarro; Y. Garjjo; A. Silván; L. García; J. García; M. Brandt
Unidad de Reproducción Asistida, Hospital "La Moraleja" (Sanitas). Madrid
e-mail: frguijarro@yahoo.es

INTRODUCCIÓN

Buscamos conocer si existe una correlación real entre el Índice de Masa Corporal (IMC) con la calidad espermática.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realiza un análisis retrospectivo sobre los pacientes que llegan a nuestro laboratorio para realizarse un seminograma. Se incluyen en el

estudio un total de 169 pacientes que se distribuyen en los distintos grupos de IMC atendiendo a su peso y altura.

Se atiende a los parámetros principales del seminograma: volumen,

IMC	Clasificación	N
18,5-24,9	Normopeso	69
25-26,9	Sobrepeso grado I	50
27-29,9	Sobrepeso grado II (preobesidad)	33
30-34,9	Obesidad tipo I	17

Calidad seminal vs IMC



concentración espermática, movilidad progresiva (a+b) y formas normales. Se realiza un estudio estadístico comparativo mediante t-student.

RESULTADOS

No se encuentran diferencias estadísticamente significativas en los

parámetros analizados a excepción del volumen eyaculado que disminuye ligeramente conforme aumenta el IMC.

CONCLUSIONES

La calidad espermática no depende del Índice de Masa Corporal aunque sí va disminuyendo el volumen eyaculado

a medida que se va aumentando el sobrepeso.

130: PRIMER NACIMIENTO EN LA CLÍNICA MENCÍA EN UN CASO DE HIPERPLASIA GLANDULAR ATÍPICA DE ENDOMETRIO. NUESTRA EXPERIENCIA

A. Fernández, B. de la Torriente Benito
Clínica Mencía
e-mail: biologa@clinicamencia.es

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los cánceres de endometrio aparecen en una situación de hiperestronismo, siendo la lesión precursora la hiperplasia endometrial que se define como una proliferación de

glándulas de tamaño y forma irregular con un incremento de la relación glándula-estromal en comparación con el endometrio proliferativo. Se subdividen en dos grandes grupos, las que no presentan atipia celular y las que sí presentan atipia. La hiperplasia

atípica parece ser el único precursor real ya que se encuentra en úteros con cáncer de endometrio, presenta una gran similitud morfológica con este tipo de neoplasia y se localizan en su proximidad.

OBJETIVOS

El Objetivo de este trabajo es presentar la experiencia clínica de un ciclo de ovodon en una paciente con hiperplasia glandular atípica.

La paciente de 44 años, viene a consulta para control gestacional en el 2009, el embarazo termina en aborto espontáneo en el 1º trimestre, además ya había sufrido otro aborto a los 6 meses, en 2007. Tras un año de esterilidad, y objetivarse baja reserva ovárica, se somete a un ciclo de ovodon.

MATERIAL Y MÉTODOS

La estimulación ovárica de la donante de ovocitos fue con 150 unidades

de Fostipur durante 8 días y además se administró Decapeptyl 0,1 como agonista, la ovulación fue inducida con una inyección de Ovitrelle 250 microgramos.

La receptora tuvo transferencia con ciclo natural objetivándose el día 9º de ciclo un endometrio de 9 mm, triple línea y un folículo de 18 mm en el ovario derecho. Se desencadenó la ovulación con 1 ampolla precargada de Ovitrelle. El día de la punción folicular se asociaron dos óvulos de Progeffik 200mg.

RESULTADOS

Tras la punción ovárica de la donante, se realiza la transferencia embrionaria en Día+3.

A los trece días de la transferencia embrionaria evaluamos la β -hCG en sangre, logrando embarazo (1.500 mU/ml). Díez días después de la prueba de embarazo se confirma por ecografía, resultando dos sacos gestacionales. Nacen dos niños sanos a las 34 semanas.

CONCLUSIONES

La decisión de realizar la transferencia con ciclo natural en la paciente receptora, parece una buena elección en pacientes con Hiperplasia Glandular Atípica.

131: UBICACIÓN DEL CORPÚSCULO POLAR EN ICSI

F, Guijarro; E, Garijo; A, Silván; Y, Garijo; L, García; J, García; M, Brandt
 Unidad de Reproducción Asistida, Hospital "La Moraleja" (Sanitas). Madrid
 e-mail: frguijarro@yahoo.es

INTRODUCCIÓN

Para realizar microinyección espermática, el corpúsculo polar del ovocito debe situarse a las 12 (arriba) o las 6 (abajo) para evitar interferir en la placa metafásica pero, ¿alguna de las dos posiciones puede favorecer la fecundación o mejorar la calidad embrionaria?

MATERIAL Y MÉTODOS

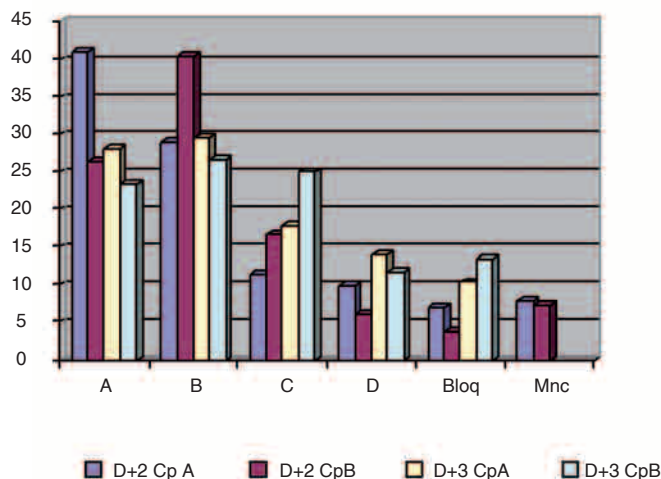
Se realiza microinyección a un total de 297 ovocitos situando el corpúsculo polar arriba (12) en 181 de ellos y abajo (6) en 116. Se analiza la tasa de fecundación en cada uno de los dos grupos, así como las calidades embrionarias tanto en D+2 como en D+3 basándonos en la clasificación según ASEBIR. Se analiza

también el bloqueo embrionario y la aparición de multinucleación. Se utiliza para el análisis estadístico el test del Chi cuadrado.

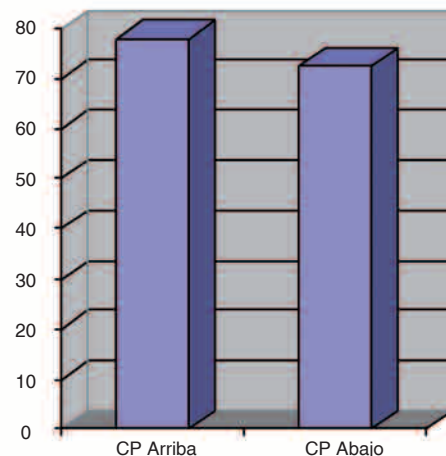
RESULTADOS

En cuanto a tasas de fecundación no se observan diferencias estadísticamente significativas dependiendo de dónde

Calidades embrionarias respecto a la ubicación del CP durante la ICSI



Tasas de fecundación respecto a la ubicación del CP durante la ICSI



se sitúe el corpúsculo polar durante la microinyección.

Respecto a las calidades embrionarias, si bien es cierto que parece haber un mayor porcentaje de embriones de tipo A en D+2 cuando el ovocito ha sido microinyectado con el CP arriba, estos porcentajes se igualan cuando los

embriones se dejan para transferir en D+3. Tampoco se observan diferencias significativas en cuanto al bloqueo embrionario o la multinucleación.

CONCLUSIONES

Durante la microinyección espermática no tiene relevancia dónde se sitúe

el corpúsculo polar (arriba o abajo) siempre y cuando no se incida directamente sobre la placa metafásica.

132: INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN SÉRICA DE ESTRADIOL SOBRE LA TASA DE RECIÉN NACIDO VIVO EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA

R. Requeijo, E. Fernández, P. Esteban, D. Rodríguez, P. Casado, C. Pousa, M.A. Andrade
Hospital Xeral-Ciés de Vigo
e-mail: Raquel.Requeijo.Pascual@sergas.es

INTRODUCCIÓN

La estimulación ovárica controlada es un paso imprescindible en las técnicas de reproducción asistida para la obtención de una cohorte folicular madura. Esto se asocia a niveles suprafisiológicos de estradiol, hasta diez veces mayores que en un ciclo natural. Y aunque es bien conocido el papel del estradiol para una adecuada implantación embrionaria, sus niveles elevados durante los ciclos de reproducción asistida han sido objeto de debate durante años.

OBJETIVOS

Evaluar el efecto de los niveles séricos de estradiol en la tasa de recién nacido vivo (tasa de RNV) el día de la administración de hCG en los ciclos de reproducción asistida con estimulación ovárica controlada bajo protocolo largo con análogos agonistas de la GnRh.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se revisaron 573 ciclos de reproducción asistida entre 1/1/08 y 31/12/09 (pacientes de edad media 35 años). Se excluyeron ciclos de donación de ovocitos y DPI; pacientes ≤ 18 y ≥ 41 años; segundos y sucesivos ciclos; protocolos de estimulación distintos;

ciclos cancelados; y en los que no hubo transferencia.

Se realizó un protocolo largo con agonistas de la GnRh (Decapeptyl®, Ipsen Pharma y Synarel®, Pfizer) y administración de FSH recombinante (Gonal-F®, Merck-Serono o Puregon®, Schering-Plough) y hMG (Menopur®, Ferring). La ovulación se provocó con 6500 UI de hCG recombinante (Ovitrelle®, Merck-Serono) al determinarse ecográficamente la presencia de dos o más folículos ≥ 18 mm.

La punción ovárica ecoguiada se hizo 34-36 h después. Se inseminaron los ovocitos a las 4-6 h mediante FIV (49.5%), ICSI (33.2%), o de forma mixta (20.9%). La transferencia de 1, 2 o 3 embriones se hizo al 2º-3º día de desarrollo embrionario. El soporte de la fase lútea se hizo mediante la administración intravaginal de progesterona micronizada (Utrogestán®, SEID o Progeffik®, Effik) desde el día siguiente a la captación ovocitaria hasta la semana 11 de gestación.

Los niveles séricos de estradiol se determinaron mediante inmunolectroluminiscencia (Cobas 6000, Roche) el primer día de la

estimulación ovárica y en los controles ecográficos que se realizaron hasta la administración de la hCG.

Para el análisis estadístico se empleó el paquete SPSS-15.0. Clasificamos mediante análisis de percentiles a las pacientes en tres grupos según el nivel de estradiol alcanzado el día de la administración de hCG (Grupo 1 < 1476 , Grupo 2 $= 1476-3100$, Grupo 3 > 3100 pg/ml).

RESULTADOS

Para estudiar el efecto del estradiol sobre la tasa de RNV en función de la edad, se dividió a las pacientes en dos grupos: < 38 años y ≥ 38 años. En el grupo de < 38 años la tasa de RNV se incrementa progresivamente junto con los niveles de estradiol, aunque a partir de 1476 pg/ml la diferencia de edad deja de ser estadísticamente significativa. En las ≥ 38 años, a pesar de no ser estadísticamente significativo, también encontramos una mayor tasa de RNV a mayores niveles de estradiol el día de la hCG.

Tasa total de RNV = 30.2% (173/573). Tasa de RNV según el nivel de estradiol: Grupo 1 = 19.7%, grupo 2 = 30.7%, y grupo 3 = 39.2%. Se observa una mayor tasa de RNV a mayor nivel de estradiol, aunque es en este grupo

donde encontramos una menor edad media de las pacientes. Los datos sólo son estadísticamente significativos comparando los grupos 1 y 2.

CONCLUSIONES

- Mayores niveles de estradiol predicen una mayor tasa de RNV.

- El efecto del nivel de estradiol el día de la administración de hCG está relacionado con la edad. Sin embargo, encontramos beneficio tanto en mayores como en menores de 38 años.

- Aunque los niveles suprafisiológicos de estradiol podrían ocasionar una alteración en el ratio estradiol/

progesterona o una disminución en la receptividad endometrial, nuestros resultados muestran que el incremento del nivel de estradiol resulta beneficioso.

133: INSEMINACIÓN INTRAUTERINA EN CICLOS FIV/ICSI CON FALLO DE PUNCIÓN

M.V. Aparicio, R. Mendoza, B. Corcóstegui, R. Matorras, Tx. Martínez-Astorkiza
Hospital de Cruces- Barakaldo, Vizcaya
e-mail: m.victoria.aparicioprieto@osakidetza.net

INTRODUCCIÓN

El objeto de este estudio ha sido determinar si tiene alguna utilidad realizar inseminaciones intrauterinas en aquellas pacientes que encontrándose en un ciclo FIV/ICSI, el día de la punción folicular no se obtiene ningún ovocito.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado un estudio retrospectivo de 6.178 ciclos realizados en la Unidad de Reproducción Humana del Hospital de Cruces – Barakaldo (Vizcaya) entre los años 1994 y 2010, de los cuales en 47 casos no se obtuvieron ovocitos. De estos 47 casos en 23 (48,9%) se realizó Inseminación Artificial Conyugal post punción y en 24 (51,1%) casos no se realizó la inseminación. Ni en la edad media de las pacientes, ni en la de los varones se han encontrado diferencias significativas.

Las estimulaciones se realizaron con FSH, o FSH más HMG, bajo frenación hipofisaria.

Se realizaron controles de estradiol y controles ecográficos del desarrollo folicular, encontrándose en un 85,11% que el estradiol en el día de la administración de hCG fue mayor de 800 pg/ml y en el 91,5% el recuento folicular fue mayor o igual a 3 folículos mayores de 15 mm.

En 78,26% el REM era mayor de 3 millones.

En 12,76% existía un factor tubárico relativo y en un 14,89% mixta (tubárico relativo y factor masculino o endometriosis).

Las punciones foliculares se realizaron ecográficamente.

No se han encontrado diferencias significativas, en ninguno de los parámetros estudiados, edad media de las pacientes, edad media de los varones, pauta de estimulación, horas post hCG, parámetros seminales, desarrollo folicular.

RESULTADOS

No se ha producido ningún embarazo tras realizar la inseminación artificial intrauterina en dichas pacientes.

CONCLUSIONES

La IAC de rescate tras fracaso de obtención de ovocitos tiene una probabilidad de éxito menor del 4,3% (1/23). Su utilidad clínica por lo tanto parece controvertida.

The logo features a stylized city skyline in orange and brown tones, with a bridge structure in purple and blue. Below the skyline are wavy lines in blue and brown, suggesting water and land. The text 'ASEBIR' is in a large, black, serif font with a green dot above the 'i'. Below it, 'VI CONGRESO GIRONA 2011' is written in a bold, red, sans-serif font.

ASEBIR
VI CONGRESO GIRONA 2011

ASOCIACIÓN PARA EL ESTUDIO DE LA BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

ASEBIR

asebir@asebir.com | www.asebir.com