

ASEBIR

EMBRIOLOGÍA CLÍNICA Y BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

Noviembre 2015 **VOL. 20 N° 2**

- 8** PROGRAMA CIENTÍFICO CONGRESO ASEBIR
- 19** SESIÓN DE ANDROLOGÍA
- 24** SESIÓN DE EMBRIOLOGÍA
- 28** SESIÓN DE CRIOBIOLOGÍA
- 31** EXPOSICIÓN PREMIOS EMB-ASEBIR 2013
- 43** SESIÓN DE GENÉTICA
- 51** DEBATE
- 68** SESIÓN DE CALIDAD
- 73** PONENCIA DE CLAUSURA
- 77** COMUNICACIONES ORALES
- 124** COMUNICACIONES PÓSTER



Imagen portada:

Gráfica VIII Congreso Asebir

SUMARIO

EDITORIAL 6

Yosu Franco y Montse Boada

PROGRAMA CIENTÍFICO CONGRESO ASEBIR.... 8

SESIÓN DE ANDROLOGÍA 19

Antioxidantes y Calidad Seminal

Ana M^a Puigvert Martínez

Abordaje de la Azoospermia

Miguel Ruiz Jorro

SESIÓN DE EMBRIOLOGÍA 24

Dimorfismo Ovocitarios

Laura Rienzi

Peculiaridades del Cultivo hasta Blastocisto

Aisling Ahlstrom

SESIÓN DE CRIOBIOLOGÍA 28

Ventaja y Problemática de Trabajar con un Banco de Óvulos.

Transporte de Gametos y Embriones

Enrique Criado Scholz

Large Volume Vitrification: The Metastable Advantage

James J. Stachecki

EXPOSICIÓN PREMIOS EMB-ASEBIR 2013 31

Determinación del perfil metabólico del medio de cultivo embrionario como posible marcador no invasivo de calidad embrionaria

Irene Cuevas Saiz

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

Belén Lledó Bosch

SESIÓN DE GENÉTICA 43

Epigenética y Reproducción Asistida

Cristina Camprubí Sánchez

DEBATE 51

Screening de Enfermedades Recesivas para Donantes y Pacientes

Ernesto Boch

Encarna Guillén Navarro

Pedro José Femenía López

SESIÓN DE CALIDAD 68

Sistema de Biovigilancia en TRA en España:

Efectos y Reacciones Adversas

Marta Cortes García

Medición y Validación de Parámetros Esenciales en el LRHA:

Temperatura, CO₂ y pH

Nicolás Prados Dodd

PONENCIA DE CLAUSURA 73

Dancing with the chromosomes towards blastocyst

Luca Gianaroli

COMUNICACIONES ORALES 77

COMUNICACIONES PÓSTER 124

Noviembre 2015 Vol. 20 N°2

EDITA

Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción

EDITORES Y DIRECTORES CIENTÍFICOS

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

COMITÉ EDITORIAL

Presidente:

Montserrat Boada Palá. Institut Universitari
Dexeus- Barcelona

Vicepresidenta:

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

Secretaría y RRPP:

Anna Serra Peruchet. IBILAB-Illes Balears

Tesorería:

Josep Santaló Pedro. Universidad Autónoma
de Barcelona-Bellaterra

Patrocinios:

Aranzazu Galán Rivas. IVI Valencia-Valencia

Vocalía de Grupos de interés e investigación:

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

Vocalía de Publicaciones y Congresos

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

Vocalía de Docencia y Formación

Francisco Javier Vendrell Montón. Sistemas genómicos S.L.,
Sueca-Valencia

José Luis de Pablo Franco. ART Vitoria, Vitoria.

Vocalía Tecnología de la información y comunicación

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

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

PUBLICIDAD Y COLABORACIONES

Secretaría ASEBIR

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

DISEÑO Y MAQUETACIÓN

Góbalo, Agencia Creativa Digital

C/ Castillo de Fuensaldaña 4 · 28232 Las Rozas, Madrid
Tfno.: 91 626 39 74 · www.gobalo.es · hola@gobalo.es

Depósito legal: M-18873-1996 | ISSN: 1136-4424

Soporte válido: 78-R-CM

Estimados/as Compañeros/as:

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

El proyecto de realizar el congreso en San Sebastián (Donosti) nació hace varios años tras considerar que poseía todas las características e infraestructuras necesarias para acoger un congreso de ASEBIR. Recientemente se ha reconocido como quinto mejor destino turístico del mundo, se ha nombrado ciudad de la ciencia y de la innovación y es ciudad de referencia europea para el 2016.

Igual como en las pasadas ediciones, el programa científico se estructura en distintas sesiones, cada una de ellas correspondiente a uno de los Grupos de Interés; Embriología, Genética, Calidad, Andrología y Criobiología que en este congreso se incorpora tras su reciente creación. También se dispondrá de 4 Simposios Satélites con ponentes invitados de gran prestigio. En esta edición, el Comité Científico ha dedicado muchos esfuerzos para poder presentar un interesante programa con los aspectos más novedosos de nuestra especialidad. Nos complace anunciaros que este año se ha incrementado en un 70% el número de trabajos aceptados para ser presentados de forma oral. En total se presentarán 38 comunicaciones orales y 138 posters cuya visualización podrá realizarse a través de 4 pantallas digitales. Asimismo se han organizado 2 cursos pre-congreso que por su temática estamos convencidos que os van a interesar: Seguridad Laboral en el laboratorio de Reproducción Humana y ¿Cómo ganarle la partida a un referee? Claves metodológicas. Epidemiología y Estadística de un estudio de embriología clínica. También el miércoles por la mañana, antes del congreso se celebrará la tercera convocatoria del examen para la obtención de la "Certificación ASEBIR en Reproducción Humana Asistida. Embriología Clínica" que cuenta con 42 inscritos. Hasta el momento somos 210 socios los que disponemos de esta certificación. Os animamos a certificaros!

Queremos agradecer de forma muy especial el esfuerzo realizado por parte de nuestras empresas proveedoras. Su compromiso con ASEBIR es constante y su colaboración imprescindible para poder hacer realidad el Congreso. También queremos agradecer 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 vuestro centro. Esperamos que en la próxima edición podáis asistir! .Gracias también al Comité Organizador, Comité Científico y, en especial, a la Secretaría Técnica de ASEBIR.

Ya para finalizar, daros la bienvenida a San Sebastián, ciudad, cosmopolita y acogedora que espera que vuestra estancia sea agradable y provechosa. La ciudad es un goce para los ojos, es poesía. Es encantadora no solo por su paisaje sino también por su gastronomía reconocida como una de las mejores del mundo. También es uno de los lugares más elegantes con sus palacetes que miran orgullosos al mar Cantábrico, los veleros que decoran la Bahía de la Concha, los bares de pintxos de la zona vieja y el Kursaal que iluminado de noche parece ser un sol rectangular que ha rodado por la arena de la playa. Bienvenidos a La Bella Easo, deseamos que os encontréis como en casa.

Ongi Etorri Bella Easora, gustora sentitzea espero dugu.



Yosu Franco Iriarte
Presidente del Comité Organizador



Montserrat Boada Palà
Presidenta de ASEBIR 2013-2017



Irvine **Scientific**

Algo está cambiando...

www.biocareeurope.com
info@biocareeurope.com





2015 VIII CONGRESO SAN SEBASTIAN ASEBIR

COMITÉ DE HONOR

Excmo. Sr. D. Alfonso Alonso Aranegui

Ministro de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Gobierno de España

Excmo. Dr. D. Jon Darpón Sierra

Consejero de Salud del Gobierno Vasco

Ilmo. Sr. D. Denis Itxaso González

Primer Teniente de Diputado General

Diputado Foral de Cultura, Turismo, Juventud, Deportes y Cooperación

Gipuzkoako Foru Aldundia - Diputación Foral de Gipuzkoa

Excmo. Sr. Prof. Dr. Luis Casis Sáenz

Secretario General de la Real Academia de Medicina del País Vasco.

Catedrático-Director. Dpto. de Fisiología. Facultad de Medicina y

Odontología. Universidad del País Vasco/EUH

COMITÉ ORGANIZADOR LOCAL

PRESIDENTE

Yosu Franco Iriarte

VOCALES

Victoria Aparicio Prieto
Lorena Crisol Ortiz
José Luis de Pablo Franco
Arantxa Guembe Echarri
María José Iñarra Velasco
Zaloa Larrateagui Laiseca
Miren Mandiola Arizmendiarieta
Belén Murillo Guibert
Carmen Ochoa Marieta
Carmen Puyo Gómez
M^a José Torelló Ybañez
Jesús Zulategui Eraso

COMITÉ CIENTÍFICO

PRESIDENTE

Yosu Franco Iriarte

VOCALES

Antonio Alcaide Raya
Montserrat Boada Palá
Inmaculada Campos Ramírez
Cristina Camprubí Sánchez
Enrique Criado Scholz
Jorge Cuadros Fernández
Cristina González Ravina
Mark Grossmann i Camps
M^a Victoria Hurtado de Mendoza y Acosta
M^a Dolores Lozano Arana
Nereida Ortiz Piñate
Esther Velilla García
Xavier Vendrell Montón



SECRETARÍA TÉCNICA GRUPO PROCESS

Betaproces, 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: info@congresoasebir.es

CRÉDITOS Y AUSPICIOS

Actividad acreditada por el Consejo Vasco de Formación Continuada de las Profesiones Sanitarias con 0.7 créditos. (Actividad de Formación Continuada registrada con el número 338/15)



CONGRESO AUSPICIADO POR



Sociedad Española
de Contracepción (SEC)



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



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



Real Academia de Medicina
del País Vasco

CURSOS PRECONGRESO

MIÉRCOLES, 18 DE NOVIEMBRE DE 2015

Curso Precongreso nº 1. Seguridad laboral en el laboratorio de reproducción humana.

Curso Precongreso nº 2. ¿Cómo ganarle la partida a un referee?

Claves metodológicas: epidemiología y bioestadística de un estudio de embriología clínica.

PROGRAMA CIENTÍFICO

MIÉRCOLES, 18 DE NOVIEMBRE DE 2015

16:00 - 17:00 hrs. Inauguración VIII Congreso ASEBIR

17:00 - 18:00 hrs. SESIÓN 1 – Andrología (1ª Parte)

Moderadores Presidenta GI de Andrología: Cristina González Ravina, IVI Sevilla, Sevilla y M^a Victoria Aparicio Prieto, Hospital Universitario de Cruces, Barakaldo, Bizkaia

17:00 - 17:30 hrs. Antioxidantes y Calidad Seminal

Ponente: Ana M^a Puigvert Martínez, Hospital Quirón Barcelona, Barcelona

17:30 - 18:00 hrs. Abordaje de la Azoospermia

Ponente: Miguel Ruiz Jorro, CREA, Valencia

18:00 - 18:10 hrs. Pausa

18:10 - 19:00 hrs. SESIÓN 1 – Andrología (2ª Parte)

Moderadores: Presidenta GI de Andrología: Cristina González Ravina, IVI Sevilla, Sevilla y M^a Carmen Puyo Gomez, Centro Ginecológico El Cano, Bilbao

18:10 - 19:00 hrs. Comunicaciones Andrología

18:10 – 18:20 hrs. CO-01 - Efecto de la congelación de espermatozoides no seleccionados sobre la integridad del ADN espermático en muestras normozoospermicas.

*A. Barberá Alberola, J. Bataller Sanchez, M. Tormos Berenguer, M. Ruiz Jorro
CREA, Valencia*

18:20 – 18:30 hrs. CO-02 - Estudio de la expresión del receptor de angiotensina II tipo 2 en espermatozoides humanos y su implicación en la movilidad espermática.

M. Gianzo Citores⁽¹⁾, I. Muñoa Hoyos⁽¹⁾, I. Urizar Arenaza⁽¹⁾, H. Estonba Iturriza⁽¹⁾, Z. Larreategui Laiseca⁽²⁾, J. Irazusta Astiazaran⁽¹⁾, N. Subirán Cuidad⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Universidad del País Vasco (UPV/EHU), ⁽²⁾ Clínica IVI Bilbao.

18:30 – 18:40 hrs. CO-03 - Influencia de la monoterapia con darunavir ritonavir en la calidad seminal en pacientes con VIH.

ML. López Regalado ⁽¹⁾, MC. Gonzalvo López ⁽¹⁾, A. Clavero Gilabert ⁽¹⁾, A. Benítez Martín ⁽¹⁾, M. Luengo Díaz ⁽¹⁾, P. Navas Bastida⁽¹⁾, I. Sánchez Castelló⁽¹⁾, A. Guzmán Olmedo⁽¹⁾, V. Díaz Prado⁽¹⁾, L. Martínez Navarro⁽¹⁾, MA. López Ruz ⁽²⁾

(1)Unidad de Reproducción. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada. (2) Unidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada

18:40 – 18:50 hrs. C0-04 - Utilidad de la selección magnética de células (macs) en muestras seminales utilizadas en inseminación artificial

M. Ballester Ferrer, M. Boada Palà, S. Mateo Cuadros, R. Buxaderas Sánchez, JM. Vendrell Sala, A. Veiga Lluch

Hospital Universitario QUIRÓN DEXEUS, Barcelona

18:50 – 19:00 hrs. C0-05 - El uso de espermatozoides testiculares incrementa los resultados reproductivos en pacientes con patrón de protaminas alterado

M. Guijarro Notario, M. Fernández, L. Medrano, E. Rocafort, A. Leza, B. Ramos, L. García, I. Vilella, J. Aizpurua

IVF Spain, Alicante

19:00 - 20:00 hrs. Simposio COOK - Quality in Long Culture: Pros and Cons of Culturing the Human Embryos to Blastocyst Stage

Ponente: Prof. Etienne van der Abeel, Laboratory Director at UZ Gent, Belgium

20:00 hrs. Cocktail Inaugural

JUEVES, 19 DE NOVIEMBRE DE 2015

08:30 - 10:30 hrs. SESIÓN 2 – Embriología (1º parte)

Moderadores: Presidenta GI de Embriología: M^a Victoria Hurtado de Mendoza y Acosta, Sevilla y Miren Mandiola Arizmendiarieta, Clínica Quirón Gipuzkoa, Donostia/San Sebastián

08:30 - 09:00 hrs. Dimorfismo Ovocitarios

Ponente: Laura Rienzi , GENERA, Roma, Italia

09:00 - 10:30 hrs. Comunicaciones Embriología 1 (TIME LAPSE)

09:00 – 09:10 hrs. C0-06 - Comparación de los resultados obstétricos y perinatales de gestaciones únicas procedentes de un estudio prospectivo aleatorizado; time lapse frente a incubador convencional.

T. Vilorio Samochin, F. Insua, A Galán, V Serra, A Cobo, M Meseguer
IVI Valencia, Valencia

09:10 – 09:20 hrs. C0-07 - Valores de referencia para los parámetros morfocinéticos embrionarios.

M. Canales Gijón ⁽¹⁾, A. Clavero Gilabert ⁽¹⁾, MC. Gonzalvo López⁽¹⁾, MJ .Hernández Hernández⁽²⁾, AR. Díaz Corujo⁽³⁾, B. Migueles Pastor⁽⁴⁾, I. Durán Salas⁽⁵⁾, M. Rodríguez Palomino⁽⁶⁾, A. Garrido Torrecillas⁽⁷⁾, B. González López de Bustamante⁽⁸⁾

⁽¹⁾ Unidad de Reproducción UGC Laboratorio Clínico y UGC Obstetricia y Ginecología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Instituto de Investigación Biosanitario de Granada (IIBG), Granada, España., ⁽²⁾ Centro de Asistencia a la Reproducción Humana de Canarias,

Tenerife, España., ⁽³⁾ Ginefiv, Madrid, España., ⁽⁴⁾ Ginemed, Sevilla, España., ⁽⁵⁾ Hospital Virgen del Mar, Almería, España., ⁽⁶⁾ Roquetas F.I.V., Almería, España., ⁽⁷⁾ Clínica Medrano, Algeciras, Cádiz, España., ⁽⁸⁾ Hospital Vithas Ntra. Sra. de Fátima, Vigo, España.

09:20 – 09:30 hrs. CO-08 - Estudio multicentrico prospectivo sobre morfocinética embrionaria, clasificación de asebir e implantación embrionaria.

M. Rodríguez Palomino ⁽¹⁾, M. Canales Gijón⁽²⁾, AB. Rogido Sánchez⁽³⁾, E. Martín Díaz⁽⁴⁾, I. Landaburu Marí⁽⁵⁾, A. Fernández Martín⁽⁶⁾, I. Suárez Vergara ⁽⁷⁾, M. Salas Martínez⁽⁸⁾, E. Olaya Vila ⁽⁹⁾, A. González Utor⁽¹⁰⁾, JA. Castilla Alcalá ⁽²⁾

⁽¹⁾ Roquetas F.I.V., Almería, España., ⁽²⁾ Unidad de Reproducción UGC Laboratorio Clínico y UGC Obstetricia y Ginecología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Instituto de Investigación Biosanitario de Granada (IIBG), Granada, España., ⁽³⁾ IMARA, Barcelona, España., ⁽⁴⁾ Unidad de Reproducción. Hospital Quirón, Málaga, España., ⁽⁵⁾ Instituto de Fertilidad, Palma de Mallorca, España., ⁽⁶⁾ UHRA Nisa-Ginemed, Valencia, España., ⁽⁷⁾ Unidad de Reproducción de Clínica Sanabria, Granada, España., ⁽⁸⁾ Roquetas F.I.V., Almería, España., ⁽⁹⁾ Clínica Tambre, Madrid, España., ⁽¹⁰⁾ MasVida Reproducción, Sevilla, España.

09:30 – 09:40 hrs. CO-09 - La relación de la clasificación embrionaria, obtenida a través de un sistema automático basado en morfocinética, con el potencial de implantación es independiente de la morfología embrionaria, de la calidad ovocitaria y del día de transferencia.

S. Pérez Albalá, B. Aparicio Ruiz, L. Romany Sevilla, T. Vilorio Samonchin, MJ. De los Santos Molina, M. Meseguer Escrivá
IVI Valencia, Valencia

09:40 – 09:50 hrs. CO-10 - Resultado del ensayo piloto de un programa de control de calidad externo de morfocinética embrionaria.

L. Martínez Granados⁽¹⁾, A. González Utor⁽²⁾, M. Serrano Molina⁽³⁾, V. Badajoz Liébana⁽⁴⁾, N. Prados Dodd⁽⁵⁾, E. Olaya Vila ⁽⁶⁾, A. Farreras Ayestaran⁽⁷⁾, S. Zamora López⁽⁸⁾, M. López Regalado⁽¹⁾, N. Ortiz Piñate⁽⁹⁾, JA. Castilla Alcalá⁽¹⁾

⁽¹⁾ Unidad de Reproducción UGC Laboratorio Clínico y UGC Obstetricia y Ginecología. Complejo Hospitalario Universitario de Granada. Instituto de Investigación Biosanitario de Granada (IIBG), Granada, España., ⁽²⁾ MasVida Reproducción, Grupo de Interés de Calidad de ASEBIR, Sevilla, España., ⁽³⁾ Clínica IFEM, Córdoba, España., ⁽⁴⁾ Ginefiv, Madrid, España., ⁽⁵⁾ IVI, Sevilla, España., ⁽⁶⁾ Clínica Tambre, Madrid, España., ⁽⁷⁾ Institut Marqués, Barcelona, España., ⁽⁸⁾ CEIFER, Granada, España., ⁽⁹⁾ Instituto Europeo de Fertilidad, Grupo de Interés de Calidad de ASEBIR, Madrid, España.

09:50 – 10:00 hrs. CO-11 - Indicadores morfocinéticos para la selección embrionaria en d+3.

B. Carrasco Canal, G. Arroyo Cardona, Y. Gil Saumell, MJ. Gómez Cuesta, I. Rodríguez García, PN. Barri Rague, A. Veiga Lluch, M. Boada Pala

Departamento de Obstetricia, Ginecología y Reproducción. Hospital Universitario Quirón Dexeus, Barcelona

10:00 – 10:10 hrs. CO-12 - Predicción de tasa de blastocisto, euploidia e implantación mediante parámetros morfocinéticos tempranos.

E. Rocafort Curià ⁽¹⁾, A. Leza ⁽¹⁾, M. Guijarro ⁽¹⁾, LL. Medrano ⁽¹⁾, B. Ramos ⁽¹⁾, L. García ⁽¹⁾, I. Vilella ⁽¹⁾, M. Velasco ⁽²⁾, Y. Franco ⁽²⁾, M. Fernández ⁽¹⁾

⁽¹⁾ IVF SPAIN, Alicante ⁽²⁾ IVF DONOSTI, San Sebastián

10:10 – 10:20 hrs. CO-13 - El estudio morfocinético de los preembriones tripnucleares de icsi permite predecir su corrección hacia la diploidía.

C. Albert Rodríguez, Y. Galiana Briones, L. Escrich Albelda, N. Grau Grau, P. Gámiz Izquierdo, M.J. Escribá Pérez

IVI Valencia, Valencia

10:20 – 10:30 hrs. CO-14 - Impacto de un sistema automatizado de time-lapse en un programa de ovodonación transfiriendo en estadio de blastocisto.

E. Rocafort Curià⁽¹⁾, M. Velasco⁽²⁾, A. Leza⁽¹⁾, M. Guijarro⁽¹⁾, L. Medrano⁽¹⁾, B. Ramos⁽¹⁾, L. García⁽¹⁾, I. Vilella⁽¹⁾, Y. Franco⁽²⁾, M. Fernández⁽¹⁾

⁽¹⁾ IVF SPAIN, Alicante, ⁽²⁾ IVF DONOSTI, San Sebastián

10:30 – 11:00 hrs. Coffe break

11:00 – 13:00 hrs. SESIÓN 2 – Embriología (2ª parte)

Moderadores: Presidenta GI de Embriología: M^a Victoria Hurtado de Mendoza y Acosta, Sevilla y Zaloa Larrateagui, Clínica IVI, Bilbao

11:00 – 11:30 hrs. Peculiaridades del Cultivo hasta Blastocisto

Ponente: Aisling Ahlstrom, Sahlgrenska University Hospital, Göteborg, Suecia

11:30 – 13:00 hrs. Comunicaciones Embriología 2

11:30 – 11:40 hrs. CO-15 - Los transcritos no codificantes de los ovocitos humanos se ven afectados por la edad y la reserva ovárica de la mujer.

M. Barragán⁽¹⁾, IJ. Pons⁽²⁾, A. Ferrer⁽¹⁾, A. Schweitzer⁽³⁾, J. Hubbard⁽³⁾, H. Auer⁽⁴⁾, A. Rodolosse⁽⁴⁾, R. Vassena⁽⁴⁾

⁽¹⁾Clínica EUGIN, Barcelona, ⁽²⁾Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), ⁽³⁾Affymetrix, ⁽⁴⁾Functional GenOmic Consulting.

11:40 – 11:50 hrs. CO-16 - Alteraciones de la expresión de dna metiltransferasas y de genes imprintados en ovocitos mii tras vitrificación/desvitrificación.

M. Barragán, A. Pujol, A. Obradors, V. Vernaev, R. Vassena

Clínica EUGIN, Barcelona

11:50 – 12:00 hrs. CO-17 - Rompiendo un mito: el tiempo entre puncion folicular y icsi no tiene impacto en los resultados reproductivos en los ciclos de donacion de ovocitos.

P. Barcena⁽¹⁾, M. Rodríguez⁽¹⁾, D. García⁽²⁾, A. Obradors⁽²⁾, V. Vernaev⁽²⁾, R. Vassena⁽²⁾

⁽¹⁾Clínica EUGIN, Barcelona, ⁽²⁾ Fundació EUGIN, Barcelona

12:00 – 12:10 hrs. CO-18 - Tiempos de desarrollo temprano en embriones procedentes de ovocitos frescos y vitrificados.

M. Martínez⁽¹⁾, A. Obradors⁽¹⁾, V. Vernaev⁽¹⁾, J. Santaló⁽²⁾, R. Vassena⁽²⁾

⁽¹⁾Clínica EUGIN, Barcelona, ⁽¹⁾ Universidad Autonoma de Barcelona, Bellaterra

12:10 – 12:20 hrs. CO-19 - ¿Es la trasferencia en diferido el futuro?

O. Aguirre Landaluce, A. Domingo Bilbao, JA. Agirregoikoa Iza, JL. De Pablo Franco

ART Vitoria Centro Ginecológico de Reproducción Asistida, Vitoria

12:20 – 12:30 hrs. CO-20 - Influencia de la edad en el desarrollo de blastocistos procedentes de embriones sobrantes.

V. Masedo Garcia, T. Rubio Asensio, C. Carrascosa Romero, C. López Martínez, E. López López

UR. Hospital La Vega, Murcia

12:30 – 12:40 hrs. CO-21 - Cultivo embrionario en baja y alta tensión de oxígeno: resultados obstétricos y neonatales preliminares.

P. Gámiz Izquierdo, JL. Romero Carbonell, JM. De los santos Molina, T. Vilorio Samochín, V. Serra Serra, MJ. De los Santos Molina

IVI Valencia, Valencia

12:40 – 12:50 hrs. CO-22 - Índice progesterona/ovocito frente a niveles de progesterona en sangre y su correlación con los resultados de un ciclo de fiv.

M. Luengo Díaz, A. Clavero Gilabert, B. Romero Guadix, P. Navas Bastida, I. Sánchez Castelló, A. Guzmán Olmedo, L. Martínez Granados, M. López Regalado, L. Martínez Navarro, J. Fontes Jiménez. JA. Castilla Alcalá

Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada

12:50 – 13:00 hrs. CO-23 - Mejora del potencial implantatorio de embriones de ratón obtenidos por fecundación in vitro.

N. Hernández Rollán⁽¹⁾, E. Matilla Pinto⁽¹⁾ ⁽¹⁾, C. Tobajas Vega ⁽¹⁾, J. Mijares Gordún ⁽¹⁾, FM. Sánchez Margallo ⁽¹⁾, IS. Álvarez Miguel ⁽²⁾

⁽¹⁾ Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, Cáceres, ⁽²⁾ Universidad de Extremadura, Cáceres

13:00 - 14:00 hrs. Simposio Grupo EMB - The ART of oocyte and embryo vitrification: Closing the open issue

14:00 - 15:00 hrs. Comida

15:00 - 16:40 hrs. SESIÓN 3 - Criobiología

Moderadores Presidente GI de Criobiología: Mark Grossmann i Camps, BARCELONA IVF, Barcelona y Jesús Félix Zulategui Eraso, Complejo Hospitalario Virgen del Camino, Pamplona.

15:00 - 15:30 hrs. Ventaja y Problemática de Trabajar con un Banco de Óvulos. Transporte de Gametos y Embriones

Ponente: Enrique Criado Scholz, Ovobank Spain, Marbella, Málaga

15:30 - 16:00 hrs. Large Volume Vitrification: The Metastable Advantage

Ponente: James J. Stachecki, Innovative Cryo Enterprises LLC, Linden, New Jersey, USA

16:00 - 16:50 hrs. Comunicaciones Criobiología

16:00 – 16:10 hrs. CO-24 - El análisis morfocinético de los blastocistos desvitrificados define nuevos marcadores de éxito reproductivo.

A. Galán Rivas, M. Mesguer Escrivá, A. Coelo Perles, MJ. de los Santos Molina, J. Remohí Giménez, A. Cobo Cabal

IVI Valencia, Valencia

16:10 – 16:20 hrs. CO-25 - Nuevas perspectivas en criopreservación seminal: congelación versus vitrificación.

L. Medrano López-Tello ⁽¹⁾, N. García ⁽²⁾, A. Leza ⁽¹⁾, M. Guijarro ⁽¹⁾, E. Rocafort ⁽¹⁾, B. Ramos ⁽¹⁾, MA. Fernández ⁽¹⁾, J. Aizpurua ⁽¹⁾, MJ. Gómez ⁽²⁾

⁽¹⁾ IVF Spain, Alicante. ⁽²⁾ Dto. Biotecnología. Universidad Alicante, Alicante

16:20 – 16:30 hrs. CO-26 - Rescate embrionario: resultados tras la vitrificación de blastocistos procedentes de embriones de baja calidad en d+3.

M. Solé Inarejos, B. Carrasco Canal, M. Parriego Beltran, F. Martínez San Andrés, B. Coroleu Lletget, M. Boada Pala, A. Veiga Lluch.

Servicio de Medicina de la Reproducción, Departamento de Obstetricia, Ginecología y Reproducción, Hospital Universitari Quirón Dexeus, Barcelona, España.

16:30 – 16:40 hrs. CO-27 - ¿Responden los embriones biopsiados de distinta forma a los procesos de vitrificación y desvitrificación?

MC. Tió Marquina ⁽¹⁾, J. Ten Morro ⁽¹⁾, J. Guerrero Villena ⁽¹⁾, A. Rodríguez Arnedo⁽¹⁾, MD. Pérez Izquierdo⁽²⁾, B. Moliner Renau ⁽¹⁾, A. Bernabéu García ⁽¹⁾, J. Llácer Aparicio⁽¹⁾, R. Bernabéu Pérez ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Instituto Bernabeu Alicante, ⁽²⁾ Instituto Bernabeu Cartagena

16:40 – 16:50 hrs. CO-28 - Recalentamiento ultra-rápido: altas tasas de recuperación de ovocitos vitrificados en el sistema cerrado safespeed. un nuevo paradigma en criopreservación.

M. Gallardo Molina⁽¹⁾, M. Hebles Duvison ⁽²⁾, B. Migueles Pastor⁽²⁾, M. Dorado Silva ⁽¹⁾, L. Aguilera Duvison⁽²⁾, M. González Martínez⁽²⁾, P. Piqueras Trilles ⁽¹⁾, P. Sánchez Martín⁽²⁾, F. Sánchez Martín⁽²⁾, R. Risco ⁽³⁾

⁽¹⁾ Fundación Ginemed, Sevilla, ⁽²⁾ Clínicas Ginemed, Sevilla, ⁽³⁾ Centro Nacional de Aceleradores. Universidad de Sevilla.

16:50 - 17:20 hrs. Exposición Premios EMB-ASEBIR 2013

Moderadores: Presidente del Comité Organizador, Yosú Franco Iriarte y Lorena Crisol Ortiz, Hospital Universitario Donostia, San Sebastián

16:50 -17:05 hrs. Determinación del perfil metabólico del medio de cultivo embrionario como posible marcador no invasivo de calidad embrionaria

Ponente: Irene Cuevas Saiz, Hospital General Universitario, Valencia

17:05 – 17:20 hrs. Genotipado del SNP R72P del gen p53 en pacientes con fallo de implantación y aborto de repetición y su efecto en los resultados de los ciclos de FIV

Ponente: Belén Lledó Bosch, Instituto Bernabeu, Alicante

17:20 - 17:30 hrs. Pausa

17:30 - 18:30 hrs. Simposio Merck - Simposio Merck - Tecnología para la vida

Ponentes: Diego Ezcurra, Head of Global Customers and Technologies Excellence – Global Fertility Franchise at Merck /EMD Serono

Ana Sousa, Clinical Embryology Liaison Manager - Fertility Technologies – Merck Serono España

19:15 hrs. Carrera Solidaria.

21:30 hrs. Cena y Entrega del Premio CRIO Merck Serono-ASEBIR 2015 y del Premio ASEBIR al Mejor Poster 2015

VIERNES, 20 DE NOVIEMBRE DE 2015

08:30 - 10:00 hrs. SESIÓN 4 - Genética

Moderadores Presidenta GI de Genética: Esther Velilla García, Centro de Medicina Embrionaria, Barcelona y Aranzazu Guenbe Echarri, Hospital Universitario Donostia, San Sebastián

08:30 - 09:00 hrs. Epigenética y Reproducción Asistida

Ponente: Cristina Camprubí Sánchez, GenIntegral, Barcelona

09:00 - 10:00 hrs. Comunicaciones Genética

09:00 - 09:10 hrs. CO-29 - Alteraciones de los embriones aneuploides en su morfocinética y perfil transcriptómico

M. Vera Rodríguez ⁽¹⁾, S. Chávez ⁽²⁾, C. Rubio Lluesa ⁽¹⁾, R. Reijo Pera ⁽²⁾, C. Simón Vallés ⁽¹⁾

⁽¹⁾Igenomix, Paterna, Valencia. ⁽²⁾Stanford University, USA

09:10 - 09:20 hrs. CO-30 - Desarrollo y validación de un nuevo protocolo basado en secuenciación masiva para el estudio de la aneuploidía embrionaria: la nueva generación del dgp.

R. Bautista Llacer ⁽¹⁾, X. Vendrell Montón ⁽¹⁾, V. Fernandez Pedrosa ⁽¹⁾, JC. Trivino Pardo ⁽¹⁾, C. Collado Mico ⁽¹⁾, G. Marco Puche ⁽¹⁾, E. Ferrer Robles ⁽²⁾, C. Calatayud Lliso ⁽²⁾, M. Ruiz Jorro ⁽²⁾

⁽¹⁾Sistemas Genómicos, Paterna, Valencia, ⁽²⁾CREA - Valencia, Valencia. España

09:20 - 09:30 hrs. CO-31 - Diagnóstico genético preimplantacional mediante secuenciación masiva, combinando detección de aneuploidías y trastornos monogénicos.

LA. Alcaraz Mas ⁽¹⁾, V. Penacho ⁽¹⁾, B. Ramos ⁽²⁾, M. Fernández ⁽²⁾, S. González Reig ⁽¹⁾, S. Rogel ⁽³⁾, J. Aizpurua ⁽³⁾

⁽¹⁾Bioarray, Elche, Alicante, ⁽²⁾IVF-Spain, Alicante, ⁽³⁾Universidad Pablo Olavide, Sevilla

09:30 - 09:40 hrs. CO-32 - Los polimorfismos cromosómicos incrementan la tasa de aneuploidías en gametos y embriones.

R. Morales Sabater ⁽¹⁾, B. Lledó Bosch ⁽¹⁾, JA. Ortiz Salcedo ⁽¹⁾, E. García Hernández ⁽¹⁾, H Blanca Ordoñez ⁽²⁾, J. Guerrero Villena ⁽²⁾, J. Ten Morro ⁽²⁾, J. Llácer Aparicio ⁽²⁾, R. Bernabeu Pérez ⁽²⁾

⁽¹⁾Instituto Bernabeu Biotech, Alicante, ⁽²⁾Instituto Bernabeu Alicante, Alicante

09:40 - 09:50 hrs. CO-33 - Karyomapping como herramienta para análisis de anomalías cromosómicas no detectables mediante técnicas convencionales: detección de embriones normales/equilibrados, microdeleciones/ microduplicaciones y triploides/haploides.

C. Arjona Fernández ⁽¹⁾, E. García Guixé ⁽¹⁾, M. Konstantinidis ⁽²⁾, E. Armenti ⁽²⁾, R. Prates ⁽²⁾, C. Giménez Sevilla ⁽¹⁾, M. Sandalinas Alabert ⁽¹⁾

⁽¹⁾Reprogenetics Spain S.A., Barcelona, ⁽²⁾Reprogenetics

09:50 - 10:00 hrs. CO-34 - RESCATE DE EMBRIONES SIN DIAGNÓSTICO CONCLUYENTE EN LOS CICLOS DE PGS EN D+3

M. Parriego Beltran, LL. Coll Luján, S. Mateo Cuadros, M. Tresánchez Parés, B. Coroleu Lletget, M. Boada Palà, A. Veiga Lluch

Dexeus Salud de la Mujer, Barcelona

10:00 - 10:30 hrs. Coffe break

10:30 - 12:00 hrs. SESIÓN DEBATE. Screening de Enfermedades Recesivas para Donantes y Pacientes

Moderadores Presidenta GI de Genética: Esther Velilla García, Centro de Medicina Embrionaria, Barcelona y María José Iñarra Velasco, Hospital Universitario Donostia, San Sebastián

Ponentes:

Ernesto Boch. Instituto Valenciano de Reproducción, IVI, Valencia

Encarna Guillén Navarro, H. Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia

Pedro José Femenía López. Decano Facultad Derecho, UA, Alicante

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

14:00 - 15:00 hrs. Comida

15:00 - 16:00 hrs. Simposio ORIGIO - A Single Step in the Right Direction? Experience and outcome of moving

from sequential to single-step culture for human embryos.

Ponente: Virginia Bolton, Consultant Clinical Embryologist, Guy's Hospital, London

16:00 - 17:40 hrs. SESIÓN 5 - Calidad

Moderadores: Presidenta GI de Calidad: Nereyda Ortiz Piñate, Instituto Europeo de Fertilidad, Madrid y Carmen Ochoa Marieta, Clínica COTERO, Centro CER, Santander

16:00 - 16:30 hrs. Sistema de Biovigilancia en TRA en España: Efectos y Reacciones Adversas

Ponente: Marta Cortes García, Consejera Técnica de la Subdirección General de Cartera Básica de Servicios del SNS y Fondo de Cohesión. Secretaria de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, Madrid

16:30 - 17:00 hrs. Medición y Validación de Parámetros Esenciales en el LRHA: Temperatura, CO₂ y pH

Ponente: Nicolás Prados Dodd, IVI Sevilla, Sevilla

17:00 - 17:55 hrs. Comunicaciones Calidad

17:00 - 17:10 hrs. CO-35 - Control de calidad en laboratorios de embriología anacer: estudio de toxicidad de los guantes

E. Ferrer Robles ⁽¹⁾, A. Carrasco Acosta ⁽²⁾, A. Mauri López ⁽³⁾, Begoña Sendón Rodríguez ⁽⁴⁾, José Luís Gómez Prieto ⁽⁵⁾, Iria Martínez Arcos ⁽⁶⁾

⁽¹⁾ CREA. Centro médico de Reproducción Asistida, ⁽²⁾ Instituto de Reproducción. CEFER, ⁽³⁾ PROCREAR, Reus

⁽⁴⁾ Centro Médico Pintado. Vigo, ⁽⁵⁾ AÍSA. Reproducción y Biotecnología, Zaragoza ⁽⁶⁾ IRAGA. Unidad de Reproducción Asistida La Rosaleda, Santiago de Compostela, A Coruña.

17:10 - 17:20 hrs. CO-36 - Nuevo sistema de almacenaje de muestras criopreservadas en pajueta para prevenir mix-ups en las técnicas de reproducción asistida

S. Novo Bruña, R. Morató Molet

Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra

17:20 - 17:30 hrs. CO-37 - Estimación del riesgo de error y su control mediante sistema de radiofrecuencia en un laboratorio de fiv

A. Obradors, M. Durban, A. Rodríguez, V. Vernaeve, R. Vassena

Clínica EUGIN, Barcelona

17:30 - 17:40 hrs. CO-38 - Validación de un sistema de trazabilidad de embriones criopreservados (stec)

JC. Gómez Blanco ⁽¹⁾, JB. Pagador Carrasco ⁽¹⁾, D. García Hernández ⁽²⁾, B. Cobo Cuevas ⁽³⁾, J. Luengo Manzano ⁽³⁾, J. De Julián Fernández de Velasco ⁽⁴⁾, E. Delgado Niebla ⁽⁴⁾, FM. Sánchez Margallo ⁽¹⁾, J. Mijares Grodún ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, Cáceres, ⁽²⁾ DGH Soluciones Tecnológicas, Burgos, ⁽³⁾

Clínica IERA, Badajoz, ⁽⁴⁾ Clínica Norba, Cáceres

17:55 - 18:10 hrs. Exposición Mejor Póster 2015

Moderadores: Montserrat Boada Palà, Presidenta de ASEBIR y Yosu Franco Iriarte, Presidente Comité Organizador

18:10 - 18:40 hrs. Ponencia de Clausura

Moderadora: Montserrat Boada Palà, Presidenta de ASEBIR

Dancing with the chromosomes towards blastocyst

Ponente: Luca Gianaroli, S.I.S.Me.R. Reproductive Medicine Unit, Bologna, Italy

18:40 - 19:00 hrs. Despedida y Cierre del Congreso a cargo del Presidente del Comité Organizador, Yosu Franco Iriarte y la Presidenta de ASEBIR, Montserrat Boada Palà

21:00 hrs. Cena de Gala y Entrega de Premios EMB-ASEBIR 2015

llama ahora al
944 354 600
e infórmate

Teléfono exclusivo para
Asociados comercializado
por Segurmec

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

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



AHORA, EN TUS SEGUROS, HASTA



MESES GRATIS

y **10% de descuento** sobre tarifa de coche

- Seguro de coche
- Seguro de moto
- Seguro de hogar
- Seguro de negocios (consulta)
- Seguro Dúo Profesional (hogar + negocios)

913 278 992

www.zurich.es/colegiosprofesionales



ZURICH[®]

Oferta exclusiva* para ti y tus familiares directos por estar asociado a ASEBIR

Llévate, durante todo el 2015, 3 meses gratis al contratar y, si no tienes siniestros el primer año, 2 meses gratis más en la primera renovación.

*Promoción válida para las nuevas pólizas de AUTO (exclusivamente turismos o furgonetas de uso particular) con la modalidad de Terceros Completo (Terceros + robo + lunas + incendio) o Todo Riesgo con Franquicia, pago anual y el tomador, conductor y/o propietario con al menos 5 años de carné, MOTOCICLETAS con pago anual y el tomador, conductor y/o propietario con al menos 5 años de carné y HOGAR con las coberturas de continente y contenido, y CONSULTAS y DÚO PROFESIONAL con pago anual; que sean emitidas entre el 1 de noviembre de 2014 y el 31 de diciembre de 2015, ambos inclusive y con fecha de efecto (entrada en vigor) desde el 1 de noviembre de 2014 hasta el 31 de diciembre de 2015, ambos inclusive. En la contratación quedan excluidos de la promoción los reemplazos, es decir, los riesgos ya asegurados con Zurich Seguros en cualquiera de sus canales de distribución. Promoción no acumulable a otras promociones y/o descuentos. Mecánica: se devolverá al cliente el importe equivalente a 3 meses de prima del seguro contratado en el momento de la contratación y solo si el cliente no declara ningún siniestro (cualquier suceso amparado en la póliza de seguros) en el primer año, se le devolverán otros 2 meses de la prima del seguro contratado en el momento de la primera renovación. Los clientes que no cumplan este requisito solo tendrán derecho a 3 meses gratis. La devolución se realizará mediante transferencia bancaria al cliente en un plazo máximo de 45 días desde la fecha de recibo liquidado. Para contratar y participar en la promoción llama al 913 278 992. Producto intermediado por SegurMec Correduría de Seguros, S.L. DGSFP J1281. El corredor recomienda estos productos sobre la base del análisis objetivo previsto en la Ley de Mediación de seguros y reaseguros privados. Estos productos pertenecen a Zurich Insurance plc, Sucursal en España.

ANTIOXIDANTES Y CALIDAD SEMINAL

Ana Mª Puigvert Martínez
Unidad de Reproducción Hospital Quirón. Barcelona
ampuigvert@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Cerca del 15% de parejas que buscan descendencia presentan un proceso de infertilidad. El factor masculino representa aproximadamente el 50% de dichas parejas. (1)

Si bien en un porcentaje nada despreciable de casos podemos llegar al diagnóstico etiológico del factor masculino de la infertilidad. Cuando nos encontramos ante una infertilidad masculina idiopática empleamos la clasificación descriptiva del seminograma para determinar el factor que define la infertilidad masculina.

En este último decenio se ha normalizado el estudio del factor oxidativo del espermatozoide mediante la determinación del índice de fragmentación de DNA espermático mediante varias metodologías diagnósticas, ello ha venido acompañado de la aparición de múltiples preparados dietéticos (2) para el tratamiento oral de la fragmentación de DNA espermático y subsiguiente mejoría, en algunos casos de parámetros seminológicos.

La integridad del DNA espermático es un factor necesario para garantizar la correcta transmisión del material genético (3). Su alteración podría comprometer la fertilización.

Ante esta situación se plantearía lógico el tratamiento del componente oxidativo mediante el empleo de sustancias antioxidantes que podrían contrarrestar y, de esta forma, mejorar la calidad seminal y su capacidad fertilizante.

La presencia en el mercado de un gran número de preparados, con múltiples principios activos y gran variabilidad de dosificación así como su empleo indiscriminado y la ausencia de criterios y protocolos de actuación

han cuestionado la eficacia de este tratamiento.

DISCUSIÓN

El tratamiento antioxidante en la infertilidad masculina, es una terapia empírica cuya primeras referencias son tan antiguas como la propia humanidad y su deseo de fertilidad.

La base por la cual se emplean antioxidantes en el tratamiento de la infertilidad está basada en el proceso de liberación de radicales libres mediante liberación de los ROS (4) (formas reactivas del oxígeno) que, cuando se produce un desequilibrio en su producción satura los mecanismos antioxidantes de la vía seminal provocando alteraciones espermáticas. (tabla 1)

Peroxidación de ac. Grasos polinsaturados	Alteración de membrana acrosómica
Alteración ATP	Astenozoospermia
Fragmentación DNA	Variabilidad de parámetros seminales

Tabla 1: Efectos de la ROS sobre los espermatozoides.

Estos procesos tóxicos, hoy en día conocidos y tipificados, eran catalogados no hace mucho tiempo como factor tóxico epididimario y eran tratados con sustancias antioxidantes.

Es importante especificar que los suplementos alimentarios se caracterizan por tener un registro sanitario específico no farmacológico, por lo tanto las dosificaciones no son terapéuticas sino suplementarias para complementar una dieta inadecuada por lo tanto, es primordial tener en cuenta que su efecto sería en aquellos casos en que se produce un desequilibrio nutricional o bien requiere de una sobredosificación de alguno o varios elementos para mejorar y contrarrestar el factor oxidativo en el proceso formativo del espermatozoide.

Para determinar cuál o cuáles son los suplementos alimentarios con efecto antioxidante o específico en las características seminales de los pacientes es indispensable determinar perfectamente la etiología de la misma y llevar a cabo aquellos estudios que determinaran el proceso evolutivo de la espermatogénesis del individuo.

CONCLUSIÓN

En la mayoría de los estudios publicados (5) se confirman los efectos beneficiosos de dichos antioxidantes en cuanto a parámetros seminales y específicamente en la astenozoospermia.

Cuando conseguimos determinar correctamente las características seminales y el proceso de infertilidad los resultados con tratamientos antioxidantes mejoran

significativamente los parámetros seminales. Esta mejoría observada se asocia con un aumento significativo de gestaciones espontáneas.

AGRADECIMIENTOS

Mi especial agradecimiento a todo el equipo de la unidad de reproducción asistida de Quirón Alfons Comins formado por ginecólogos, biólogos, psicóloga, técnicos de laboratorio, equipo administrativo que entienden perfectamente el trabajo en equipo y la indispensable necesidad del estudio del factor masculino.

CONFLICTO DE INTERESES

Declaramos que no existe ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1.I.D.Sharlip ,J.P.Jarow,A.M.Belker et al "Best practice policies for male infertility ".Fertility&Sterility ,vol.77 , n°5 , pp.873-882-2002.

2.Wirleitner B,Vanderzwalmen P. et al "Dietary supplementation of antioxidants improves semen quality of IVF patients in terms of motility ,sperm count and nuclear vacuolization.".Int.J.Vitamin Nutr. Res.2012 Dec.82(6)391-8.

Doi:10.1024/0300-9831/a000136.

3.Evenson DP,Wixon R."Data analysis of two in vivo fertility studies using sperm chromatin Structure assay-derived DNA fragmentation index vs.pregnancy outcome."Fert.Ster.2008,90:1229-31.

4.LanzafameFM,LaVigneraSetal."Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility "Reprod. Biomed On line . 2009 ,19(5) 638-59.

5.Imamovic S.Pinter B. "Review of clinical trials on effects of oral antioxidants on basic semen and other parameters in idiopathic OTA".Biomed R.Int.Vol 2014 ,ID 426951.

ABORDAJE DE LA AZOOSPERMIA

Miguel Ruiz Jorro.

CREA - Medicina de la Reproducción. Valencia

miguel.ruiz@creavalencia.com

INTRODUCCIÓN

El estudio del factor masculino es un apartado fundamental de la medicina reproductiva, por su incidencia y por su repercusión. Para el andrólogo clínico, los casos de varones con azoospermia son especialmente apasionantes, porque en ellos tiene una mayor probabilidad de alcanzar el diagnóstico etiológico de la enfermedad. Sencillamente, porque cuenta con más oportunidades para conseguirlo, ya que en los casos de pacientes con presencia de espermatozoides en el eyaculado, por escasos que estos sean, y no digamos ya si la dispermia es moderada, es tristemente frecuente que el paciente no llegue a la consulta del andrólogo, que la única prueba diagnóstica que se le realice sea un espermiograma y que dependiendo del resultado de este, se decida ya el tratamiento de reproducción asistida que con extraordinaria frecuencia, será un ICSI.

La aparición del ICSI, en la década de los 90, fue posiblemente uno de los peores acontecimientos para la salud reproductiva del varón, porque si bien permitió algo tan importante como que muchos hombres pudieran tener descendencia con sus propios gametos, hizo también que se perdiera interés en la búsqueda de la causa

que estaba originando la patología. Afortunadamente, en la actualidad prima la voluntad de ofrecer la mejor calidad asistencial a los pacientes que consultan por infertilidad o esterilidad y para conseguir este objetivo, es necesario ofrecer no solo efectividad en los tratamientos, sino también seguridad. La "gestión del riesgo" se ha establecido como algo primordial, también en las unidades de medicina reproductiva. Y a todos los niveles, incluido el estudio del factor masculino y esto es especialmente evidente en aquellos casos de pacientes con oligozoospermia severa, criptoospermia o azoospermia.

GESTIÓN DEL RIESGO RELACIONADO CON EL FACTOR MASCULINO EN CASOS DE PACIENTES CON AZOOSPERMIA

La estimación del "riesgo relacionado con el factor masculino" debe establecerse, en nuestra opinión, en todas las parejas, sin excepción, y fundamentalmente, a tres niveles:

- 1 - Riesgo para el propio paciente.
- 2 - Riesgo para su descendencia.
- 3 - Riesgo para el resultado del tratamiento.

1 - ESTIMACIÓN DEL RIESGO PARA EL PROPIO PACIENTE

La esterilidad masculina puede estar relacionada o ser consecuencia directa de una patología severa en el varón que pueda comprometer no solo su salud reproductiva sino también su salud general. Un diagnóstico seminal patológico puede ser debido, por ejemplo, a una alteración endocrina, o metabólica o a un proceso inflamatorio a nivel del tracto genital. De especial importancia son los casos que presentan oligozoospermia muy severa, criptoospermia o azoospermia. Si en estos pacientes se sospecha un origen secretor (no obstructivo) de la dispermia, se debe valorar la posible existencia de un tumor testicular, sobre todo cuando se asocian otras patologías como criptorquidia y/o hipospadias. Se ha descrito una relación no casual entre estas cuatro entidades (oligozoospermia severa, criptorquidia, hipospadias y cáncer testicular) en lo que se ha llamado Síndrome de Disgenesia Testicular. Esta relación estaría debida posiblemente a un origen común que podría ser, entre otros, la exposición a disruptores estrogénicos en el momento de la diferenciación y desarrollo gonadal del feto. El cáncer de testículo es el tumor más frecuente en varones jóvenes y su incidencia está aumentando notablemente en países industrializados, aunque su pronóstico es muy bueno cuando se detectan de forma inicial, como cuando se descubren

al hacer una ecografía escrotal en pacientes que consultan por esterilidad. Los pacientes con criptorquidia tienen una mayor probabilidad de que se desarrolle un proceso neoplásico a nivel testicular, especialmente si no se realiza orquidopexia antes de la pubertad. Los varones con recuento espermático muy bajo o inexistente también tienen mayor incidencia de cáncer de testículo. En un estudio realizado en nuestro centro en candidatos a donantes de semen, al realizar ecografía escrotal en aquellos con concentración espermática inferior a 1 millón por c.c. se descubrió la presencia de cáncer de testículo en el 11,8% de casos.

Para poder valorar este riesgo para el propio paciente, será imprescindible en todos los casos la realización de una Anamnesis completa, Exploración genital, y confirmación del diagnóstico Seminal, y en un gran porcentaje de casos, además, valoración Hormonal y estudio Ecográfico urológico y genital que incluya el estudio de los riñones, ya que por ejemplo, la agenesia congénita de deferentes se asocia a mayor probabilidad de agenesia renal, vejiga, próstata, vesículas seminales, cordón, contenido escrotal, epidídimos, testículos.

2 - ESTIMACIÓN DEL RIESGO PARA SU DESCENDENCIA

Se debe valorar el riesgo de transmitir una discapacidad, malformación o alteración genética al utilizar, para el tratamiento de reproducción asistida, los gametos del paciente. La azoospermia de origen secretor se asocia a una mayor probabilidad de alteraciones genéticas en los espermatozoides, ya sea debido a su etiología, como por ejemplo una alteración en el Cariotipo, o por la existencia de una meiosis patológica que produzca una tasa aumentada de espermatozoides con aneuploidías y que también podría estar relacionado con un mayor riesgo de enfermedades epigenéticas.

Para valorar este riesgo, especialmente de transmisión de alteraciones genéticas, será imprescindible la realización de un Cariotipo, determinación de Microdelecciones en

el cromosoma Y y estudio de la Meiosis a nivel testicular. Para llevar a cabo el estudio de la meiosis, hay que hacer una Biopsia Testicular. Los casos de azoospermia debida a una Agenesia Bilateral Congénita de Deferentes (ABCD) se asocian a Mutaciones en el gen relacionado con la Fibrosis Quística. Por ello, en el caso de que obtengamos espermatozoides del parénquima testicular, habrá que hacer una secuenciación completa del Gen CFTR y estudio de polimorfismo T y en el caso de hallar cualquier mutación, será necesario realizar también el estudio en la mujer para determinar el riesgo de Fibrosis Quística.

3 - ESTIMACIÓN DEL RIESGO PARA EL PRONÓSTICO DEL TRATAMIENTO

A partir de la interpretación de los resultados de las pruebas anteriormente descritas, se podrá determinar el tratamiento más adecuado en cada caso. Se habrá determinado el riesgo relacionado con el factor masculino, para el propio paciente y para su descendencia, pero debemos prever también las opciones de éxito al aplicar este tratamiento, y entendemos por éxito el nacimiento de un niño, o niña, sanos. Por tanto, deberemos valorar si hay factores que puedan afectar a la capacidad reproductiva de los espermatozoides; a su capacidad de fecundar y de dar lugar a embriones sanos, con alta tasa de implantación y desarrollo evolutivo y normal. Sabemos que entre las causas más frecuentes de aborto o fallo de implantación está la presencia de alteraciones en la información genética de los embriones. Estas alteraciones pueden proceder del espermatozoide, fundamentalmente por la presencia de aneuploidías y/o de fenómenos de apoptosis. El estudio de la meiosis nos habrá dado información sobre el riesgo de aneuploidías en los espermatozoides y en este caso, nuestra experiencia es favorable a la realización de Diagnóstico Genético Preimplantacional para conseguir una buena probabilidad de parto, de la misma manera que lo aconsejamos en mujeres con mayor riesgo de aneuploidías en sus ovocitos por edad avanzada u otra causa. Otro aspecto a tener en cuenta es la presencia de signos de

apoptosis en los espermatozoides que también comprometería el desarrollo embrionario normal. La integridad del ADN espermático puede perderse por la presencia de ROS. En algunos casos, la azoospermia puede estar asociada a procesos inflamatorios o a varicocele, que causan estrés oxidativo. En el caso de espermatozoides de testículo o epidídimo, estos carecen de la protección antioxidante que aporta el plasma seminal, por lo que la manipulación de estas muestras en el laboratorio debe ser extremadamente delicada. Algunos estudios apuntan hacia la existencia de una relación específica entre la presencia de alteraciones genéticas en espermatozoides y la presencia de apoptosis, como un proceso de control de calidad a nivel intratesticular. Nuestros datos indican que la eliminación de espermatozoides apoptóticos mediante columnas de anexina en pacientes con FISH en espermatozoides alterado, reduce de forma significativa no solo el porcentaje de espermatozoides apoptóticos sino también el de espermatozoides aneuploides. En cualquier caso, será difícil aplicar técnicas específicas de selección de espermatozoides no apoptóticos en muestras de parénquima testicular.

CLASIFICACIÓN DE LA AZOOSPERMIA

Existen varias propuestas para clasificar los diferentes tipos de azoospermia. La razón para hacer esta clasificación es precisamente facilitar la toma de decisiones sobre el tratamiento más adecuado a realizar en cada caso. Se ha propuesto, por ejemplo, clasificarlas en azoospermias tratables o no tratables, o de origen genético y no genético, o en pre-testiculares, testiculares y post-testiculares, o en primarias y secundarias, según sean congénitas o adquiridas, pero lo más habitual es clasificarlas en Secretoras (o Testiculares) y Excretoras (u Obstructivas). Se podría proponer también una clasificación en base al riesgo asociado a cada una de ellas, ya sea para el propio paciente, para su descendencia o para el tratamiento, pero la misma etiología estaría fácilmente clasificada en diferentes apartados.

Teniendo en cuenta estos aspectos y en base a la sospecha diagnóstica que hayamos alcanzado, nosotros utilizamos la clasificación que se detalla en la Tabla I.

curisan con mayor riesgo de alteración genética transmisible si se utilizan espermatozoides propios, como son las debidas a una causa genética, bien sea por alteraciones en el cariotipo,

gigante, etc.

En el grupo de azoospermia por disfunción eyaculatoria, destacamos la Eyaculación Retrógrada, aunque

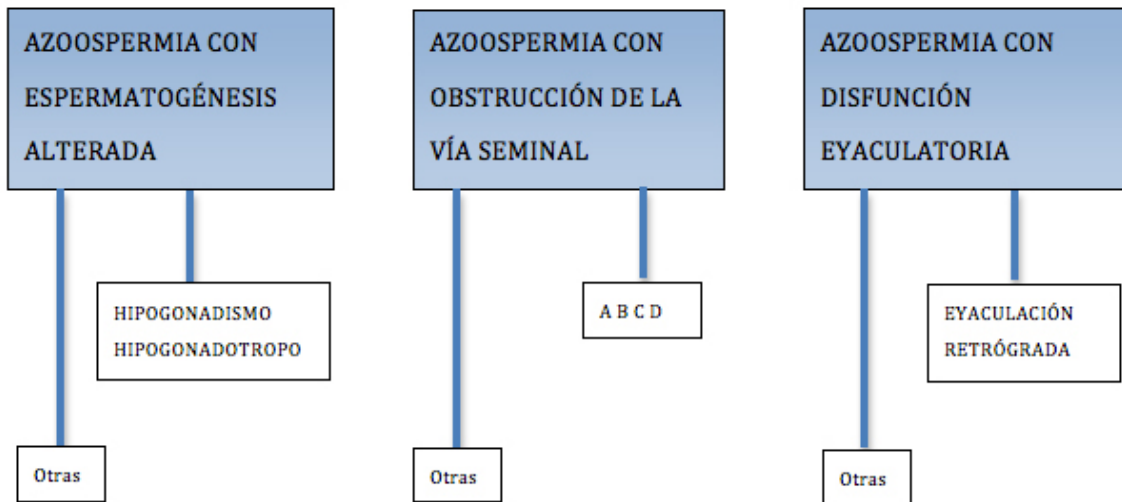


Tabla 1: Clasificación de las azoospermias

En esta clasificación, se diferencian tres grupos: Azoospermia con alteración en la espermatogénesis, Azoospermia con obstrucción de la vía seminal y Azoospermia con disfunción eyaculatoria.

El primer grupo cursa con una mayor incidencia de alteraciones genéticas en los espermatozoides - cuando los hay - así como peor pronóstico reproductivo y un posible mayor riesgo para la salud del varón. Dentro de este grupo, se diferencian las azoospermias causadas por alteraciones endocrinas, como el hipogonadismo hipogonadotropo, con o sin alteraciones olfatorias, que tienen una idiosincrasia particular, pues pueden ser tratables y no parecen relacionadas con riesgo genético en los espermatozoides ni para la salud del varón. Otras causas de disfunción hipotálamo-hipofisarias son el déficit de GnRH, ya sea primario (Prader-Labhart-Willis) o secundario a un trauma o un proceso tumoral. Otras causas de azoospermia que cursan con disfunción en la espermatogénesis son secundarias a algún tipo de proceso ya sea infeccioso, como tras una parotiditis, o traumático, como la torsión testicular. En estos casos tampoco hay riesgo genético. Pero las más frecuentes son las que sí

como el Síndrome de Klinefelter y otras variantes, o por microdeleciones en el cromosoma Y, etc. También las debidas a alteraciones en la Meiosis, bloqueos madurativos, hipoespermatogénesis, aplasia germinal. Consecuencia de proceso neoplásico testicular. O de origen iatrogénico tras radioterapia o quimioterapia, tratamientos hormonales, por ejemplo con testosterona, tratamientos quirúrgicos, como criptorquidia, orquidopexia, orquiectomía, etc. Anorquia congénita. También puede existir azoospermia por sustancias gonadotóxicas de origen laboral o medioambiental.

En el grupo de las azoospermias obstructivas diferenciamos también la debida a Agenesia Bilateral Congénita de conductos Deferentes (ABCD), porque a diferencia del resto de este grupo, presenta, como hemos explicado, un posible riesgo genético para la descendencia que debe ser tenido en cuenta. Entre otras causas de azoospermia de origen obstructivo encontramos las debidas a cirugías, como la vasectomía, pero también tras cirugía de hernia inguinal, abscesos complicados, etc. Síndrome de Young, procesos inflamatorios a nivel prostato-vesicular o epididimario, utrículo

esta cursa más frecuentemente con oligozoospermia severa o criptoazoospermia que con azoospermia. Otras patologías cursan más bien con aspermia que es la ausencia total de semen eyaculado. Puede ser debida, por ejemplo, a factores neurológicos, como en los lesionados medulares, pero también a la imposibilidad de obtener una muestra de semen por causas psicológicas. En este grupo, en general, se puede intentar un tratamiento médico específico o bien aplicar técnicas de reproducción asistida de baja complejidad y con buen pronóstico.

BIOSIA TESTICULAR. OBTENCIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDEOS

Siempre, en todos los casos de azoospermia en los que por uno u otro motivo se vaya a hacer una biopsia testicular, esta se realizará previamente al tratamiento de reproducción asistida. En los casos de azoospermia secretora, porque nos dará tiempo a tener el resultado de la meiosis que nos permitirá decidir si está indicado o no hacer DGP en los embriones. En los casos de azoospermia obstructiva, incluso en los debidos a vasectomía previa, también, pues aunque tengamos la convicción de que hay espermatogénesis normal

y ampliamente suficiente como para poder hacer un ICSI, está descrito que el tiempo transcurrido desde la obstrucción hace que el testículo vaya fabricando menos espermatozoides y podría darse el caso de que al hacer una biopsia el mismo día que la aspiración folicular de la mujer, tras haber llevado esta toda la medicación de la estimulación y haberse sometido a la intervención y a la anestesia, no encontraríamos espermatozoides en el parénquima testicular.

Si recuperamos espermatozoides, estos se pueden guardar congelados y su potencial reproductor no disminuye. Si no hay buena muestra para poder congelar, repetiremos la biopsia el día de la aspiración folicular, sabiendo, ahora sí, que sí hay espermatogénesis. La biopsia testicular es un procedimiento

quirúrgico sencillo y ambulatorio. Cuando la realizamos con fines diagnósticos, lo mejor es obtener una muestra suficientemente grande como para poder buscar espermatozoides en fresco para congelar, poder hacer el estudio de meiosis y poder hacer una anatomía patológica. Cuando se trata de una reintervención, puede utilizarse la aspiración percutánea si hay una buena producción de espermatozoides, teniendo en cuenta que en estos casos podremos controlar mucho peor la hemostasia. En casos de espermatogénesis muy aislada, los mejores resultados parecen obtenerse mediante microaspiración.

CONCLUSIONES

El abordaje de la azoospermia, desde el punto de vista de la valoración

del riesgo relacionado con el factor masculino, es beneficioso para el propio paciente, para su descendencia y para el pronóstico del tratamiento.

El varón con azoospermia tiene una enfermedad y tiene derecho a ser diagnosticado y tratado de la forma más específica, sencilla, eficaz y segura posible.

El pronóstico del tratamiento de reproducción asistida depende de la causa de la azoospermia y de la aplicación del tratamiento adecuado.

Los casos con mayor riesgo de aneuploidías espermáticas, podrían presentar también mayor incidencia de apoptosis.

OOCYTE DIMORPHISMS IN IVF

Laura Francesca Rienzi

GENERA Centres for Reproductive Medicine, Rome, Marostica, Umbertide, Naples

rienzi@generaroma.it

INTRODUCTION

The oocyte morphological evaluation represents a key point in the everyday laboratory routine. In fact, oocyte quality is strongly related to deriving embryo developmental competence and ability to implant. The early selection of the oocytes to be used for in vitro fertilization techniques thus signifies a valid tool for the reduction of the number of embryos to be created without affecting the overall pregnancy. Scientific literature on the subject has been really prolific in the last decade. Surely many Authors have spent a great effort in order to find a correlation between certain morphological dysmorphisms and the IVF/ICSI and clinical outcomes. Nevertheless, only recently these data have been reviewed in order to draw general conclusions and propose standardization in the interpretation of the data (1,2,3).

CUMULUS-CORONA-OOCYTE-COMPLEX (CCOC)

The CCOC morphological analysis is considered the first-line evaluation of oocyte quality. The CCOC of a mature oocyte should be highly expanded and mucified as the consequence of the active secretion of hyaluronic acid which interposes among the CCs conferring to the complex a fluffy appearance. However, it has been shown that the aspect of the CCOC is a poor predictor of embryo developmental competence. However, given the bidirectionality of oocyte-CCs metabolic communication, non-invasive analysis (transcriptomics and proteomics) of CCs could provide additional information about oocytes quality and their potential to develop into implantating embryos after fertilization, thus implementing the traditional CCOC morphological assessment.

NUCLEAR MATURITY

Nuclear maturity is morphologically assessed by light microscopy through the visualization of the first polar body (IPB) in the perivitelline space (PVS). Oocytes displaying the IPB are presumably at the metaphase II (MII) stage, in which the homologous chromosomes are aligned at the spindle equatorial plate during meiosis II. It is well recognized that in stimulated cycles about 85% of the retrieved oocytes expose the IPB and are thus classified as MII, whereas about 10% show an intracytoplasmic structure called "germinal vesicle" (GV) characteristic of the Prophase of meiosis I (PI), and the last about 5% lack both IPB and GV. These latter are generally classified as Metaphase I (MI) although they may have undergone GV breakdown but not yet progressed to the true MI stage. Moreover, the inadequacy of solely light microscopy analysis is underlined by the fact that some oocytes classified as MII are immature despite the presence of IPB in the PVS, being at the early telophase phase of meiosis I. In these cases, additional information can be obtained by the visualization of the meiotic spindle (MS).

CYTOPLASMIC AND EXTRACYTOPLASMIC FEATURES

Unfortunately, the assessment of nuclear maturity alone is not sufficient for a complete morphological classification of the oocytes. In fact, a number of cellular events are also necessary for egg activation and fundamental to guarantee correct fertilization and further embryo development. A more informative picture can thus be obtained by the evaluation of the so called "cytoplasmic maturity" by the analysis of cytoplasmic and extracytoplasmic features such as size, shape, ooplasm texture, zona pellucida, perivitelline space and first polar body aspect.

CONCLUSIONS

The mechanisms underlying the acquisition of the oocyte competence is undoubtedly complex and it seems clear that the simple assessment of egg morphology is alone not sufficient to select the gamete with the higher developmental potential among a cohort of normal-appearing companions. To date, later morphological analysis (pronuclear, cleavage stage embryo and blastocyst evaluation) in conjunctions with the oocyte morphological assessment, remains the milestone in routine clinical applications. The advent of novel methodologies such as metabolomics, transcriptomics and proteomics may be a tool for implementing the state-of-art, but further studies are necessary in order to ensure reliability and sensitivity of these methods.

REFERENCES

Rienzi L, Vajta G, Ubaldi F. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. *Hum Reprod Update*. 2011; 17:34-45.

Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod*. 2011; 26:1270-1283.

Rienzi L, Ubaldi F. Oocyte retrieval and selection. In: Gardner DK, Weissman A, Howles CM and Shoham Z, eds. *Textbook of assisted reproductive technologies. Laboratory and clinical perspectives*. 3rd ed. London, UK: Informa Healthcare; 2009:85-101.

CULTURING TO BLASTOCYST

Aisling Ahlström

IVF lab Reproductive medicine, Sahlgrenska University Hospital, Gothenburg, Sweden.

aisling.ahlstrom@vgregion.es

Abstract: Blastocyst transfer is one approach being used to achieve higher implantation and live birth rates compared to cleavage stage embryos (1-6). Delaying transfer and prolonging embryo culture to blastocyst stage is argued to improve uterine and embryonic synchronicity, and selection of the most viable embryo(s). Embryos that reach blastocyst stage are considered to have an innately higher implantation potential due to exhibiting a functional embryonic genome that can control cell division and differentiation into the two different cell types; ICM and TE cells (7-8). There are of course a great number of embryos that fail to reach blastocyst stage of development and reasons may be linked to deficient conditions provided during IVF rather than non-functional genomes. As such, many IVF clinics prefer to restrict blastocyst culture for patients with a 'good' number of fertilized zygotes or a 'good' number of quality embryos on day 2 of development, hoping to avoid cancellation of embryo transfer.

We know from evidence that certain patient characteristics such as age, cause of infertility and antral follicle count can influence successful blastocyst culture, and although we cannot correct for these we can account for many other determinants which are under our control.

Historically, large scale production of viable human blastocysts was only accomplished after the introduction of sequential media culture systems, and later with contemporary single step media. Thereafter, numerous modifications to IVF conditions have been tested, some reportedly leading to improved success rates, low oxygen level as an example.

In this presentation we will discuss factors that influence blastocyst culture and gain a better understanding of how we can improve success rates.

1. Blake DA, Farquhar CM, Johnson N, Proctor M. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;CD002118.
2. Glujovsky D, Blake D, Bardach A, Farquhar C. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev* 2013, Issue 6.
3. Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998;13:3434-40.

4. Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril* 1998;69:84-8.

5. Papanikolaou EG, Camus M, Kolibianakis EM, Van Landuyt L, Van Steirteghem A, Devroey P. In vitro fertilization with single blastocyst-stage versus single cleavage-stage embryos. *N Engl J Med* 2006;354:1139-46.

6. Papanikolaou EG, Kolibianakis EM, Tournaye H, Venetis CA, Fatemi H, Tarlatzis B, Devroey P. Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2008;23:91-9.

7. Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1999a;11:307-11.

8. Gardner DK, Schoolcraft WB. In vitro culture of human blastocyst. . In: In Janson R, Mortimer, D. Eds., editor. *Towards reproductive certainty: infertility and genetics beyond 1999.*: Carnforth: Parthenon Press, 1999b:378-88.



RI Witness™

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



www.embiol.com



PRIMO VISION™

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



Vitrolife 

G - TL

PRIMER MEDIO ÚNICO DISEÑADO
ESPECÍFICAMENTE PARA TIME-LAPSE



Vitrolife 

G - 185

INCUBADOR DE SOBREMESA CON CONCENTRACIONES
DE CO₂ Y O₂ PROGRAMABLES



- » 10 Posiciones de incubación y 1 de calentamiento
- » Recuperación inmediata de condiciones de cultivo
- » Software de control

SYSTEMS

KIVEX BIOTEC LTD

Micropipetas WALLACE

MICROPIPETAS PARA MICROMANIPULACIÓN



- » Amplia gama de modelos
- » Máxima calidad y precisión

wallace™

PROS Y CONTRAS DE TRABAJAR CON UN BANCO DE OVULOS. TRANSPORTE DE CELULAS

Enrique Criado Scholz
Ovobank Spain, Marbella, Málaga
ecriados@fivmarbella.com

1.- INTRODUCCION

Definición de banco de óvulos: Explicar la diferencia entre banco de óvulos y banco de semen.

Hablar sobre la ILEGALIDAD de estimular a donantes sin tener una paciente asignada para "hacer banco" y de la importancia de controlar esta práctica tan extendida hasta ahora.

2.- VENTAJAS

Cómo han cambiado las nuevas tecnologías:

El avance en la vitrificación y los resultados de algunos centros (supervivencia y embarazo).

Se matizará que los resultados de los embarazos dependen de "mil" factores:

Vitrificación: Quién, cuándo y cómo.

Desvitrificación: Quién y cómo.

ICSI: Quién y Cuándo (1 hora, 2 horas, 3 horas después congelación)

Calidad seminal: fallo de fecundación, fallo de desarrollo embrionario....

Cultivo: Condiciones del laboratorio, manos del embriólogo, material utilizado (pipetas de boca o strippers),

Transferencia: Embriólogo, Ginecólogo, Medio de cultivo, Catéter, Paciente

(útero fácil o difícil, lugar de la realización, condiciones del quirófano), etc...

Receptora.

El avance en los transportes (por tierra o por aire).

El avance en el control de temperatura y el seguimiento de las curvas de calentamiento.

Ahorro económico: Cuadro del ahorro de los centros por número de tratamientos. Ahorro en personal. Ahorro en tiempo. Ahorro en problemas.

3.- INCONVENIENTES

No tienes control de la vitrificación ni de la estimulación: esto se vence confiando alguna vez y probando trabajar con un banco para que vean que es una opción muy ventajosa.

Problemática de que siempre todo es culpa del banco.....: Desmontar este escenario ya que hay "mil" variables que pueden cambiar el resultado.

Calidad de los óvulos: SIEMPRE depende de la edad de la donante y si tiene menos de 30 años es garantía absoluta de calidad. % de resultado por edad de donante.

Problemas que pueden surgir: Cancelación de la donante, mala estimulación de la donante,

equivocación de la donante al ponerse la medicación, ovulación por parte de la donante. TODO LO ASUME EL BANCO.

Hay que reportar el resultado de la descongelación de las células TAN PRONTO COMO SEA POSIBLE!! Importantísimo para trazabilidad y calidad de la colaboración.

4.- FUTURO

Como veo a mis ojos esta situación del boom de los bancos en el mundo.

5.- TRANSPORTE DE CÉLULAS

IATA. Mercancía NO PELIGROSA.

Exportación e importación de gametos y embriones. Reglamentación.

Importancia de seguir la legalidad española y europea.

6.- CONCLUSIONES

Importancia de crear un permiso especial para banco de semen y banco de óvulos y con unos controles trimestrales y anuales para garantizar la calidad de las células y la trazabilidad.

Importancia del registro de donantes y del registro de actividad de centros OFICIAL o al menos de recepción o emisión de células entre centros colaboradores.

LARGE VOLUME VITRIFICATION: THE METASTABLE ADVANTAGE

James J. Stachecki, Ph.D.
 Innovative Cryo Enterprises LLC, New Jersey, USA
jstachecki@gmail.com

Purpose: To gain a more complete understanding of the basic concept of cellular vitrification. To describe in detail the 2 types of vitrification systems used in human IVF clinics from a cryobiology point of view.

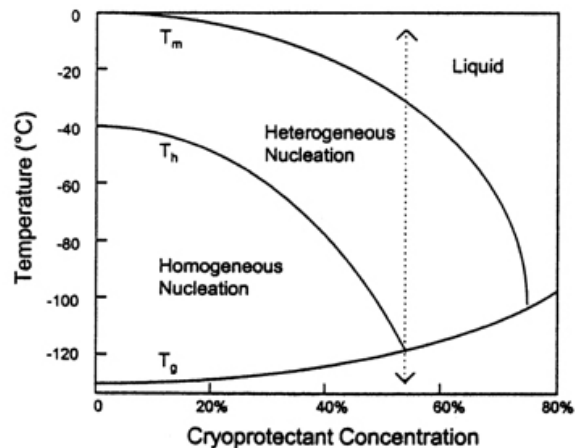
INTRODUCTION:

The only method of stable and long-term (practically infinite) preservation and storage of any perishable biological materials, particularly cells, is to keep them in the glassy (vitreous) state. This was apparent to Father Luyet when he titled his pioneering work "The vitrification of organic colloids and of protoplasm". It was Luyet's work, which would make cryopreservation a science. From the outset, he recognized that ice damage must be avoided and that vitrification could be a method for long-term preservation of cell viability.

Storage of gametes and embryos has used slow cooling for most of the past 40 years, and only recently rapid cooling, as we refer to as vitrification. In actuality, both slow and rapid cooling are forms of vitrification. Slow-cooling consists of a vitrified portion and a portion made up of ice, whereas rapid cooling consists mainly of a vitrified portion. Rall & Fahy's 1985 Nature paper demonstrated that mouse embryos could be vitrified and survive by cooling them in a relatively concentrated solution and cooling at either 2500C/min or 20C/min. This demonstrated that vitrification is not rate dependent.

DISCUSSION:

If we look at a phase diagram of a cryoprotectant solution in water, we will find several sections that are either liquid, solid, or a combination of both. T_m = melting temperature; T_h = Homogeneous ice nucleation temperature; and T_g = Glass transition temperature. Above T_m exists only liquid. Between T_m and T_h is the



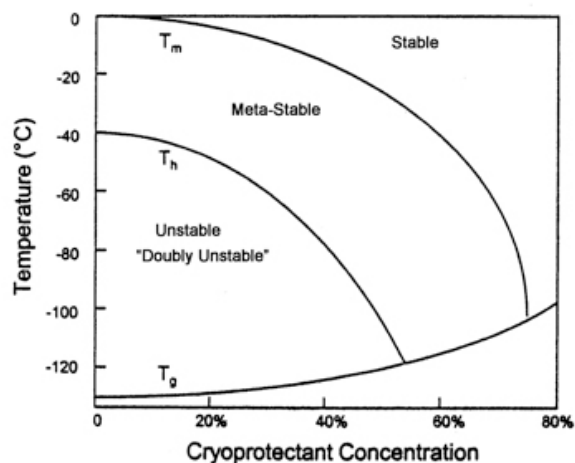
Meta-Stable region wherein ice can nucleate only by heterogeneous means. Basically, nucleation on impurities in the solution (ie. dirt particles). Below T_h both heterogeneous and homogeneous nucleation exist. In simpler terms, depending on the cryoprotectant concentration, ice can form in a solution upon cooling by either homo- or hetero-geneous means. Once the temperature reaches the glass transition temerature (T_g) the remaining solution will vitrify. Basically, solidification of water above T_g can lead to intracelular ice formation and cell death. During modern vitrification techniques we try to avoid ice formation and maximize cell survival.

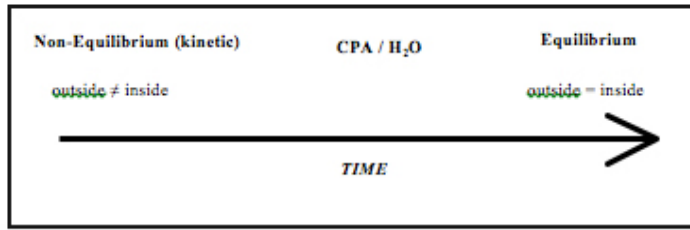
In the same graph we have relabeled the phases as stable: no ice formation; meta-stable: ice nucleation by heterogeneous

means only; and unstable or doubly unstable: ice nucleation by homo- and heterogeneous means.

The schematic below describes the effect of time in a cryoprotectant solution. When we initially place cells in a solution containing CPA's there are no CPA's inside the cell, and over time the cell will try to equilibrate with the outside solution. Thus, water leaves the cell and CPA's enter. As more time goes by, the cell will reach equilibrium or "near equilibrium". This diagram can be represented on our phase diagram below.

We have separated the graph into 4 sections representing the basic types of vitrification that can occur. On the far left and extending slightly to the right (the clear section) we have "Kinetic"

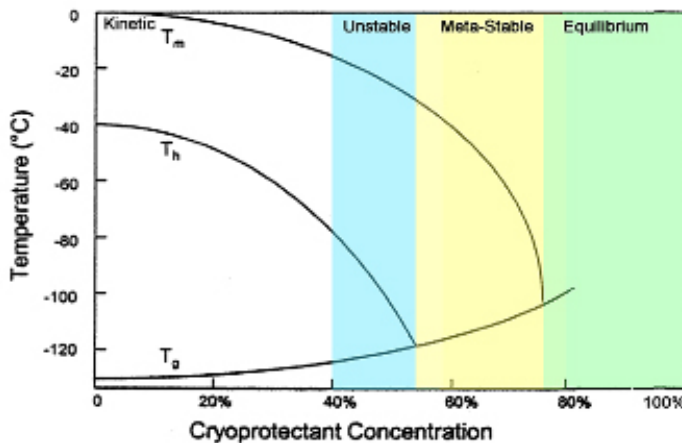




vitrification, wherein vitrification can only occur at very rapid cooling rates. The blue section, labeled “Unstable”, is the area where conventional DMSO/EG solutions lie. Here, we have to worry about both types of ice nucleation and need to cool at a relatively rapid rate (generally $>5,000^{\circ}\text{C}/\text{min}$) so that the remaining water in the cells does not nucleate to a great degree and grow during cooling. Also, rewarm has to occur at a rapid rate because the ice that did nucleate during cooling will

(approximately $> 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$) without having to worry about significant ice nucleation upon cooling. As long rewarming occurs at a relatively rapid rate we can also avoid recrystallization. The green and final section of the graph represents the area of “Equilibrium” vitrification. Here, one can cool at any rate and not obtain ice formation as the liquid phase transitions directly to the vitrified state upon falling below T_g .

During cooling in the Meta-Stable



grow (recrystallize) during rewarming, but can mostly be avoided if rewarming occurs at a fast enough rate. Increasing the DMSO concentration or using longer incubation times can shift our scenario towards the “safer” Meta-Stable area of the phase diagram, but will lead to eventual cell death due to cryoprotectant toxicity. The ICE vitrification solutions are at an effectively higher concentration such that we are in the “Meta-Stable” region of our phase diagram. Despite the uptake of more cryoprotectant, there is no appreciable toxicity from the ICE solutions, mainly because they do not contain DMSO; and as long as the exposure is not too long (sometime >10 min) the other cryoprotectants will not exert toxic effects. Here, we can cool the cells at a relatively slow rate

region we do have the possibility of nucleation via heterogeneous means. This nucleation in and of itself is not hazardous to survival of the cell. However, it poses the opportunity for ice to recrystallize upon rewarming (ie. ice can grow from the nucleation points when we warm the cells). But, similar to the Unstable region, if we rewarm fast enough we can avoid recrystallization. Because the necessary cooling rates for the ICE system are reduced, larger containers can be used, such as 0.25 or 0.5cc straws. This way, expensive,

micro-volume, open containers can be avoided and longer equilibration times are allowed.

The basic protocols for both systems are described in the table below. The major differences are the higher concentration of permeating cryoprotectants used in the ICE system, longer exposure time to the final vitrification solution, and cooling rate.

The higher cryoprotectant concentration and longer loading times help to dehydrate the cells exposed to the ICE solutions more than with the DMSO/EG system; and this effectively shifts the position of the ICE system to the right, in the phase diagram, into the Meta-Stable region, theoretically providing a more stable platform to vitrify from. Both vitrification systems require a relatively rapid rewarming rate and, if done properly, should avoid most if not all recrystallization that would be lethal to the cells. This can be demonstrated by the average blastocyst survival and clinical pregnancy rates shown in the current literature, which are above 90% and 50%, respectively.

CONCLUSION:

The basic concepts of dehydration, cooling, and solidification, as described here, provide a framework for a more complete understanding of cryopreservation as it applies to the IVF lab. It is important to understand the fundamental differences between the different types of vitrification systems available today, as this will help in choosing an optimal one for your clinic. Furthermore, it will help when troubleshooting procedural problems that may occur. When choosing a vitrification system, one should consider the pros of each, and more importantly, consider how well each system works in your particular lab, with your embryologists, and on your patients.

	DMSO/EG	ICE Vitrification
Pre-Freeze	1 step (15%)	2 steps (10%-30%)
Freeze	1 step; 60sec (30%)	1 step; 1-5 min ($>30\%$)
Warming	3 steps	5 steps
Cooling Rate	$\geq 5,000^{\circ}\text{C} / \text{min}$	$\geq 10^{\circ}\text{C} / \text{min}$
Warming Rate	??? (1000-5000 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	??? (500-2000 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$)

METABOLÓMICA DEL MEDIO DE CULTIVO EMBRIONARIO OBTENIDA POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.

Irene Cuevas, Carla Olmedo, Alba Sáez, Aila Coello, José Manuel Morales, Daniel Monleón
Unidad de Reproducción Humana del Hospital General Universitario de Valencia.
icuevassaiz@yahoo.es

INTRODUCCIÓN

Tras el nacimiento de Louis Brown en 1978 mediante fecundación in vitro, las técnicas de reproducción asistida experimentaron un auge. Actualmente la tasa de infertilidad se sitúa en torno al 15% y se estima que aproximadamente el 3% de los nacimientos en España son de niños conseguidos mediante técnicas de reproducción asistida.

A pesar de que existen restricciones legales y recomendaciones de las sociedades científicas, en España, según el último informe publicado por el Registro de la Sociedad Española de Fertilidad referente al año 2011 (Prados *et al*, 2014), el 70.9% de las transferencias son de dos embriones y un 11.1%, de tres, resultando en unas tasas de gestación múltiple del 24.1% de gestaciones de dos sacos y 0.9% de tres o más.

La tendencia de los expertos en reproducción humana es transferir el mínimo número de embriones, con la finalidad de reducir las elevadas tasas de gestación múltiple derivadas de estos tratamientos, ya que suponen un riesgo tanto para la madre como para los fetos, además de un problema tanto social, de salud y económico. Para ello es importante conocer qué embriones de la cohorte embrionaria de la paciente son los de mejor calidad, es decir, cuáles de ellos presentan mayor potencial de implantación.

La evaluación tradicional basada fundamentalmente en criterios morfológicos posee una serie de limitaciones asociadas a la metodología la cual es altamente subjetiva y presenta un relativo poder predictivo y una gran variabilidad inter- e intra-observador que limita su valor.

Dadas las limitaciones de la valoración

morfológica, la tendencia actual es encontrar, mediante el uso de nuevas metodologías, marcadores de viabilidad embrionaria, que, de una forma objetiva, puedan complementar la actual clasificación embrionaria (Gardner *et al*, 2015).

La metabolómica se define como el análisis sistemático del total de metabolitos (pequeños biomarcadores moleculares) que representan el fenotipo funcional de un sistema vivo. (Botros *et al*, 2008).

La metabolómica puede ofrecer una oportunidad única para investigar la relación entre el genotipo y el fenotipo ya que el metaboloma es el producto final de la expresión génica y, además, marca la relación entre la fisiología del organismo y las condiciones ambientales que lo rodean. (Botros *et al*, 2008; Nagy *et al*, 2008).

En el campo de la reproducción humana asistida (RHA), podemos afirmar que, debido a que el metaboloma es cambiante y diferente para cada sistema biológico y cada situación dentro del mismo sistema, se podría utilizar la metabolómica en FIV con el objetivo de ayudar en la selección embrionaria y aumentar la eficiencia de los tratamientos de FIV (Nagy *et al*, 2008).

Las metodologías utilizadas se pueden clasificar en dos grandes grupos: espectroscopía óptica y espectroscopía no óptica. La espectroscopía óptica mide la interacción de los sistemas con la radiación electromagnética (absorción, emisión o dispersión de la radiación) y engloba técnicas como la absorción ultravioleta/visible, la espectroscopia de luminiscencia y otras técnicas conocidas con el nombre de espectroscopia vibracional (espectroscopia Infrarroja (IR),

espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR) y espectroscopia Raman). Entre las técnicas de espectroscopia no óptica se encuentran la espectrometría de masas (MS) acompañada con métodos de separación como la cromatografía (líquida y de gases) y electroforesis capilar; y la resonancia magnética nuclear (RMN). (Botros *et al*, 2008; Madsen *et al*, 2009).

De todas estas, las más comúnmente utilizadas en estudios metabolómicos son la RMN, la MS y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Por otro lado, la investigación del desarrollo embrionario humano depende principalmente de los embriones obtenidos mediante TRA que son desechados por ser de menor calidad. Sin embargo, esto supone aspectos controvertidos a nivel ético e introduce subjetividad a los estudios dado que los embriones empleados son los sobrantes, que poseen peor calidad embrionaria. Gracias a los avances en los laboratorios de FIV, tanto en la obtención de ovocitos como en el cultivo embrionario, y su fácil aplicación a modelos animales resulta muy útil el empleo de estos en investigación. La experimentación animal se hace, si cabe, más imprescindible.

Históricamente el ratón, debido a sus múltiples similitudes con los humanos a nivel fisiológico y molecular, ha sido el modelo mamífero de experimentación ideal. También en el campo de la embriología, ya que los humanos y los ratones son similares morfológicamente durante el desarrollo preimplantacional.

MATERIAL Y MÉTODOS

Nuestro estudio está dividido en tres partes.

Parte 1: Creación de un modelo predictivo de implantación en día 2 de cultivo

Se recuperaron los medios de cultivo de 78 embriones transferidos a 40 pacientes que realizaron un ciclo de fecundación in Vitro en la Unidad de Reproducción Humana de nuestro centro entre 2010 y 2012, siendo criterio de exclusión la utilización de semen de donante o recuperado quirúrgicamente o factor uterino. Para obtener el perfil metabolómico se realizó el análisis retrospectivo del medio de cultivo en el que habían permanecido los embriones desde el día en el que se valoró la fecundación hasta el momento de la transferencia en día 2 de cultivo embrionario (entre 18 – 22 horas de cultivo embrionario). El medio utilizado para el cultivo fue G1 PLUS serie 5 (Vitrolife®) previamente equilibrado antes de su uso en un incubador Labotect® (6% CO₂ y 37°C) durante un mínimo de 4 horas).

Dichos medios se mantuvieron congelados a -80°C hasta su análisis, sin necesidad de dilución, mediante RMN. Todos los espectros fueron adquiridos en un espectrómetro Bruker AVANCE DRX 600 (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Alemania). Paralelamente se llevó a cabo un seguimiento de los embriones incluidos en el estudio para ver si implantaron o no. Los espectros de RMN se analizaron mediante técnicas quimiométricas y de análisis multivariable para encontrar patrones metabólicos diferenciales entre grupos. Concretamente se procesaron usando MestReNova 5.3 (Mestrelab Research S.L., España), transferidos a MATLAB 7.6 R2012a (The MathWorks Inc, Natick, EEUU). Se trabajó con la región de desplazamientos químicos comprendida entre 0.50 y 4.50 ppm (conocida como región alifática) y entre 5.20 y 10.00 ppm (conocida como región aromática).

El espectro fue dividido en segmentos de 0.005 ppm y se aplicó un análisis estadístico usando rutinas desarrolladas por el laboratorio de Metabolómica en MATLAB y la librería de análisis estadístico multivariable PLS-Toolbox (Eigenvector Research, Inc. Wenatchee, EEUU). Los datos divididos se centraron previamente al análisis multivariable.

Se aplicó un Análisis de Componentes Principales (PCA) al conjunto de datos procesados para explorar la posibilidad de una separación espontánea entre los grupos experimentales e identificar que variables contribuían más a la separación. Cuando la separación entre grupos fue compleja e incompleta, se procedió a realizar un análisis discriminante supervisado bien conocido como es el PLS-DA (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*).

Una vez construido el modelo discriminante a partir de las muestras de medio de cultivo embrionario procedimos a identificar las variables (partes del espectro) que contribuían con más peso al modelo (*loadings*) y a que metabolitos correspondían en el espectro.

Finalmente, identificados los picos más significativos para el modelo discriminatorio, procedimos a integrar el área de los picos y asignar cada señal a que metabolito pudiera corresponder. Para ciertas señales, la correcta asignación de cada pico a un metabolito resulta especialmente compleja. Esto viene dado por la baja concentración en la muestra de un metabolito o también por el alto grado de solapamiento de las señales.

Para intentar mejorar la asignación de picos empleamos secuencias especiales de asignación bidimensional (tipo TOCSY correlación ¹H-¹H y HSQC correlación ¹H-¹³C) que fueron adquiridas para un grupo seleccionado de muestras. Para la asignación de los picos e identificación de los compuestos empleamos el programa Chenomx NMR suite versión 7.1 (Chenomx Inc., Edmonton, Alberta, Canadá) y la base de datos de libre acceso *Human Metabolome Database* (<http://www.hmdb.ca>).

Parte 2: Validación del modelo predictivo de día 2 mediante embriones de ratón como modelo animal de desarrollo embrionario.

Para la segunda parte del estudio se emplearon 56 embriones de ratón en estadio de pronúcleos congelados en 10 pajuelas procedentes de un mismo lote (SFME-1-001-014) y proporcionados por

la empresa Embryotools S.L (Barcelona, España). De entre todos los metabolitos que componen el biomarcador metabólico de viabilidad, elegimos butirato, arginina y glutamato.

Se realizaron un total de siete placas de cultivo, seis de las cuales se utilizaron para el estudio de los tres metabolitos y una placa como control positivo. En cada placa se dispusieron nueve gotas de 20 µL de medio G1.5plusTM cubiertas de aceite mineral OvoilTM. Se utilizó idéntico medio al empleado en el estudio de viabilidad embrionaria. Se colocaron en la placa control ocho embriones a modo de control positivo de crecimiento sin la adición de ningún metabolito al medio. En otras seis placas se dispusieron 8 embriones por placa para probar dos concentraciones distintas de los tres metabolitos a estudio dejando vacía una gota por placa como control. Esas gotas sin embriones se cultivaron junto con las gotas con embriones para permitir a cualquier aminoácido no específico su degradación o aparición. De manera que se emplearon un total de 56 embriones para el estudio.

El medio de cultivo se enriqueció con los metabolitos seleccionados de forma que la concentración final del metabolito en el medio fue 1mM y 0,1mM y se realizó también una placa control con el medio de cultivo sin aditivos. Las concentraciones empleadas fueron estimadas tras cuantificar una muestra del medio de cultivo sin aditivos empleado para el estudio. La concentración determinada por RMN de los diferentes metabolitos empleados fue de 0,1mM para butirato y arginina, y 0,05mM para glutamato. Estas concentraciones además concuerdan con los datos publicados en la bibliografía como es el caso de un estudio para la evaluación de los efectos de diferentes concentraciones de aminoácidos en el medio de cultivo en ratones preimplantacionales cultivados in vitro (Deng *et al.*, 2005).

Los embriones se cultivaron en las placas de cultivo en incubadores a las mismas presiones de O₂ y temperatura que se emplearon en la primera parte del estudio.

Los embriones fueron evaluados a las 24, 48, 72 y 96 horas tras su descongelación para determinar parámetros morfológicos diferenciales entre grupos comparándolos con el grupo control. Dichos parámetros son los utilizados habitualmente en humanos para clasificar morfológicamente a los embriones y determinar así su viabilidad. Se valoraron el ritmo de división, número de células, grado de fragmentación, multinucleación, llegada a estadio de blastocisto y calidad del mismo.

Parte 3: Predicción de estadio de blastocisto en día 3 de cultivo.

Se analizaron retrospectivamente los medios de cultivo donde se desarrollaron 276 embriones procedentes de 62 pacientes desde día 1 hasta día 3, mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Los embriones se cultivaron en micro gotas de 40 µl de medio G1.5 (Vitrolife®) cubiertas de aceite mineral durante 46-50 horas, desde la valoración de la fecundación (día 1) hasta día 3 de cultivo. En día 3, se transfirieron a micro gotas de medio G2.5 (Vitrolife®) para su cultivo a blastocisto. Las gotas de medio G1.5 fueron recogidas en tubos Eppendorf y congeladas para su posterior análisis por RMN. El destino final de los embriones cultivados fue recogido en base de datos SPSS, registrando la llegada o no a blastocisto y su calidad.

RESULTADOS

Parte 1: Creación de un modelo predictivo de implantación en día 2 de cultivo.

Se analizaron por RMN 78 muestras, de las cuales obtuvimos el perfil metabolómico. 65 se incluyeron en el grupo de no implantación y 13 en el grupo implantación. Por cada paciente procesamos una o dos muestras según el número de embriones transferidos.

Tras el análisis y procesamiento de los espectros obtenidos, obtuvimos el gráfico PLS-DA (Figura 1), donde podemos observar una buena

separación entre muestras positivas (embriones implantados) y negativas (no implantados).

El análisis de componentes, nos muestra que 5 metabolitos participan en el modelo de forma significativa en la separación de los grupos (Tabla I) y otros 6 metabolitos que tienen una contribución importante al modelo discriminante (Tabla II).

Parte 2: Validación del modelo predictivo de día 2 mediante embriones de ratón como modelo animal de desarrollo embrionario.

Se encontraron diferencias en cuanto a la evolución y calidad de los embriones en los 6 grupos de estudio con respecto al control (Figura 2).

Con respecto a las concentraciones relativas de los metabolitos, también se encontraron diferencias entre los diferentes grupos de estudio y con respecto al control, encontrándose metabolismos más activos en los embriones que se desarrollaban y en los de mejor calidad (Tabla III).

Parte 3: Predicción de estadio de blastocisto en día 3 de cultivo.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de llegada a blastocisto y no (Figura 3). Se encontraron 2 metabolitos de la región aromática del espectro que marcaban estas diferencias.

DISCUSIÓN

Mediante la determinación del perfil metabolómico característico del embrión con mayor posibilidad de implantación, hemos construido un modelo predictivo de implantación que presenta unos excelentes resultados con una tasa de acierto próxima al 85%. El perfil metabólico diferencial se sustenta principalmente en las diferencias estadísticamente significativas de las concentraciones de hidroxisovalerato, alanina, butirato, arginina y glutamato.

Para validar el modelo empleamos embriones de ratón cuyos medios de cultivo fueron suplementados con

arginina, butirato y glutamato en concentraciones de 1 mM y 0,1 mM. Los resultados obtenidos indicaron que los embriones cultivados en medio de cultivo suplementado con arginina 0,1mM se desarrollaron con una calidad morfológica superior al resto de los grupos, incluyendo el grupo control donde se cultivaron embriones con medio de cultivo sin suplementar.

El análisis mediante RMN de los medios de cultivo suplementados en butirato, glutamato y arginina 0,1 mM donde se cultivaron los embriones de ratón mostró un aumento en la concentración de glucosa y un descenso en la concentración de piruvato y lactato en día 2 de cultivo. En día 5 fue justo a la inversa, aumentó la concentración de piruvato y lactato, y disminuyó la concentración de glucosa. Estos resultados coinciden con los requerimientos de carbohidratos publicados en la bibliografía (Gardner *et al*, 2013).

En nuestro modelo encontramos además otros metabolitos que varían sus niveles de forma apreciable y que nos indican que los patrones de utilización de los metabolitos son distintos entre embriones que se desarrollan hasta estadio de blastocisto frente a los que no lo consiguen.

Encontramos que perfiles específicos de los metabolitos glutamina, valina, aspartato y glutamato están relacionados con la formación del blastocisto.

Del mismo modo, en el modelo de predicción de llegada a estadio de blastocisto humano según el perfil metabolómico de día 3, también encontramos patrones diferenciales, aunque el modelo, en este caso, presenta diferencias estadísticamente significativas en base a dos moléculas más complejas (zona aromática del espectro). Nuestro trabajo contradice lo encontrado por Rinaudo y colaboradores (Rinaudo *et al*, 2012) que no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los patrones de embriones que llegaban a estadio de blastocisto y los que no.

En los trabajos realizados por otros grupos (Uyar *et al.*, 2014), se encuentran también diferencias en perfiles tanto de aminoácidos como de carbohidratos. Las discrepancias observadas en los resultados obtenidos por cada grupo se pueden ser debidas a gran heterogenicidad de variables introducidas en cada uno de los trabajos. Cabe destacar que si la composición inicial de los medios de cultivos empleados es diferente, los resultados obtenidos también pueden cambiar (Gardner *et al.*, 2013). Aunque actualmente las casas comerciales de medios de cultivo dan la composición cualitativa de los mismos y pueden parecer prácticamente iguales, la composición cuantitativa puede diferir mucho. Además, recientemente se ha publicado que los medios de cultivo comerciales contienen proteínas "no declaradas" (Dyrlund *et al.*, 2014) que podrían afectar a diferentes vías metabólicas del embrión.

Entre las aproximaciones no invasivas para seleccionar objetivamente el embrión con mayor potencial implantatorio de la cohorte se ha investigado con especial interés el consumo de oxígeno, reacciones redox, el consumo energético a través de Na⁺, K⁺ y ATPasas o el recambio de aminoácidos (Houghton *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 1996; Gardner *et al.*, 2001) y se están definiendo perfiles génicos, proteicos y metabolómicos para intentar detectar cuál es el embrión viable (Katz-Jaffe *et al.*, 2006; Brison *et al.*, 2007). Los biomarcadores metabólicos en el medio de cultivo suponen sin duda, en nuestra opinión, una de las estrategias más prometedoras. La búsqueda de metabolitos específicos evaluados de forma no invasiva además de correlacionarse con la viabilidad embrionaria proporciona información de la fisiología del embrión (Gardner *et al.*, 2013). El estudio del metaboloma del medio aporta información directa de aspectos claves para el desarrollo del embrión como el flujo de nutrientes y su disponibilidad, el efecto metabólico de una perturbación o del estrés del proceso, en resumen, una imagen puntual del metabolismo del sistema. Esto nos permitirá conocer los metabolitos concretos cuya adición al

medio podría suponer una mejora del rendimiento del cultivo y por lo tanto una mayor calidad embrionaria.

La determinación del perfil metabolómico asociado al medio de cultivo del embrión con mayor probabilidad de implantación va a presentar importantes aplicaciones en la FIV. Primero, resultará una herramienta importante, que junto a las técnicas de selección embrionaria utilizadas actualmente, permitirá una mejora para el proceso de selección del mejor embrión a transferir. Segundo, conocer la composición química del medio y su evolución a lo largo del proceso de crecimiento embrionario permitirá la mejora del medio de cultivo con la formulación que mejor se adapte a las necesidades nutricionales del embrión y que pueda por lo tanto mejorar su calidad. Por último, conocer mejor el metabolismo embrionario podría implicar cambios en los protocolos de cultivo existentes actualmente y que se emplean en la mayoría de laboratorios de FIV.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro equipo agradece tanto al Comité Científico de ASEBIR como a EMB (Equipos Médico Biológicos) la otorgación del Premio a la Mejor Comunicación Oral en ASEBIR 2013, gracias al cual hemos podido continuar nuestra línea de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

Botros L, Sakkas D, Seli E. Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. *Molecular Human Reproduction*; 2008;14;12:679-690.

Brison DR, Houghton FD, Falconer D, et al. Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Hum Reprod* 2004 Oct;19(10):2319-2324.

Deng X, Wang S, Huang WJ, et al. Effects of different concentrations of amino acids in the culture medium on preimplantation mouse embryodevelopment in vitro. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*. 2005 Mar;25(3):241-5.

Dyrlund T, Kirkegaard K, Toftgaard E, et al. Unconditioned commercial embryo culture media contain a large variety of non-declared proteins: a comprehensive proteomics analysis. *Hum. Reprod.* 2014; 29; (11):2421-2430.

Gardner DK, Lane M, Stevens J, et al. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril* .2001 Dec;76(6):1175-1180.

Gardner DK, Wale PL. Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer. *Fertil Steril*. 2013; 99;4: 1062-72.

Gardner DK, Meseguer M, Rubio C, et al. Diagnosis of human preimplantation embryo viability. *Hum Reprod Update*. 2015. Vol 0 (0). 1-21.

Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG, et al. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod* 2002 Apr;17(4):999-1005.

Katz-Jaffe MG, Gardner DK, Schoolcraft WB. Proteomic analysis of individual human embryos to identify novel biomarkers of development and viability. *Fertil Steril* 2006 Jan;85(1):101-107.

Madsen R, Lundstedt T, Trygg J. Chemometrics in metabolomics- A review in human disease diagnosis. *Analytica Chimica Acta*. 2009; 659;23-33.

Nagy ZP, Sakkas D, Behr B. Symposium: Innovative techniques in human embryo viability assessment: Non-invasive assessment of embryo viability by metabolomic profiling of culture media ('metabolomics'). *Reproductive BioMedicine Online*. 2008;17;4:502-507.

Prados F, Vidal E, Hernández J, et al. Registro de fecundación in vitro e inyección espermática intracitoplasmática de la Sociedad Española de Fertilidad de los años 2010 y 2011. *MEDRE*. 2014;01:33-42.

Rinaudo P, Shen S, Hua J, et al. 1H NMR based profiling of spent culture media cannot predict success of implantation for day 3 human embryos. *J Assist Reprod Genet*. 2012; 29(12): 1435-1442.

Thompson JG, Partridge RJ, Houghton FD, et al. Oxygen uptake and carbohydrate.

Uyar A, Seli E. Metabolomic assessment of embryo viability. Semin Reprod Med. 2014 Mar; 32(2):141-52.

TABLAS Y GRÁFICAS

T

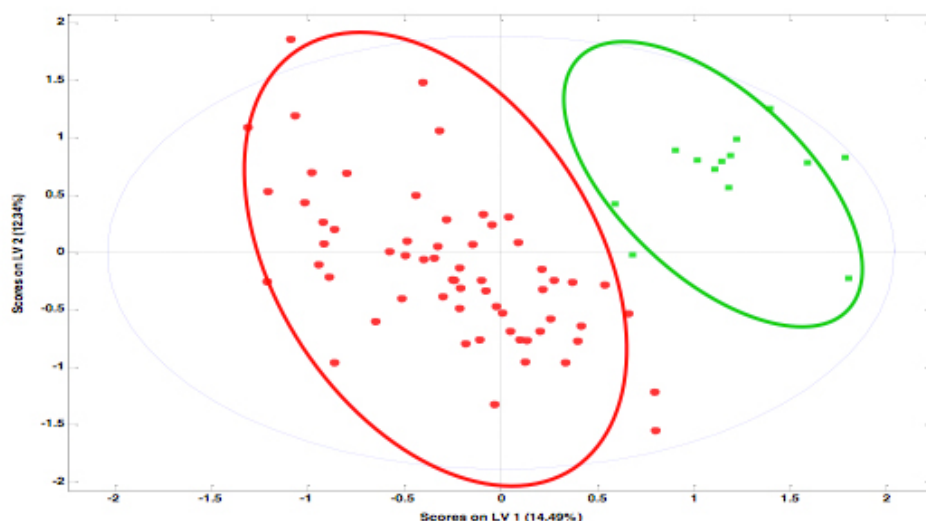


Figura 1. Diagrama de puntuaciones del análisis PLS-DA donde se muestra el agrupamiento de las muestras negativas (rojo) y positivas (verde). Las elipses dibujadas han sido incluidas solo con un objetivo ilustrador.

Región (ppm)	Metabolito	p	Positivo ± DS	Negativo ± DS
0.74-0.84	Ác.2hidroxisovalerico	0.026	0.00248 ± 1.3e-4	0.00236 ± 1.7e-4
1.46-1.49	Alanina	0.005	0.0126 ± 0.0048	0.0108 ± 6e-4
1.53-1.58	Butirato	0.038	0.00417 ± 1.4e-4	0.004 ± 2.7e-4
1.60-1.62	Arginina	0.030	0.00433 ± 3e-4	0.00413 ± 2.7e-4
2.02-2.08	Glutamato	0.0006	0.00722 ± 3.97e-4	0.00683 ± 3e-4

Tabla I. Regiones espectrales con mayor contribución al modelo discriminante. P p-valor de la comparación de medias positiva vs negativa; DS desviación estándar.

Región (ppm)	Metabolito	p	Positivo ± DS	Negativo ± DS
1.13-1.16	Propilenglicol	0.126	0.0146 ± 0.001	0.0139 ± 0.0014
1.28-1.30	Treonina	0.07	0.0174 ± 0.0102	0.0132 ± 0.0067
1.94-2.02	Prolina	0.092	0.0446 ± 0.0018	0.0431 ± 0.0031
2.36-2.40	Piruvato	0.06	0.0220 ± 0.0013	0.0239 ± 0.0023
3.27-3.32	Triptofano	0.054	0.0088 ± 0.0016	0.0077 ± 0.0018
3.81-3.92	Glucosa	0.073	0.00292 ± 1.6e-4	0.00304 ± 2e-4

Tabla II. Regiones espectrales con contribución importante al modelo discriminante. P p-valor de la comparación de medias positiva vs negativa; DS desviación estándar.

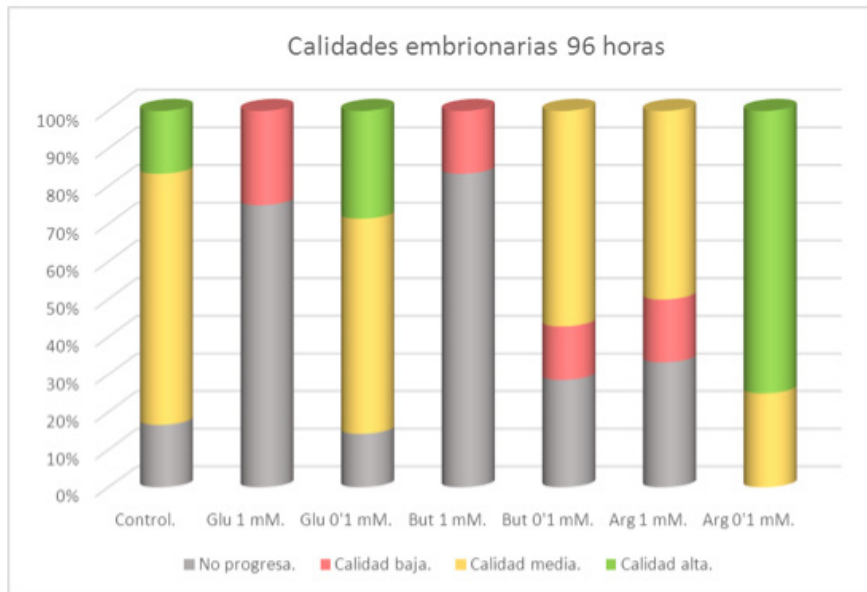


Figura 2.- Representación diferentes calidades embrionarias en los diferentes grupos de estudio y el control.

	Butirato 0,1mM	Glutamato 0,1mM	Arginina 0,1mM
D2	<p>↓ treonina</p>	<p>↓ treonina</p>	<p>↓ treonina isoleucina lactato piruvato</p>
	<p>↑ glicina alanina</p>	<p>↑ aspartato glutamato</p>	<p>↑ aspartato glutamato glucosa</p>
D5	<p>↓ butirato ↓ treonina</p>	<p>↓ glutamina ↓ triptófano isoleucina</p>	<p>↓ triptófano ↓ isoleucina valina glutamina glucosa</p>
		<p>↑ aspartato</p>	<p>↑ alanina glutamato piruvato lactato</p>
D5-D2	<p>↓ butirato ↓ treonina</p>	<p>↓ glutamina ↓ triptófano isoleucina</p>	<p>↓ glutamina ↓ triptófano isoleucina glucosa</p>
		<p>↑ treonina</p>	<p>↑ treonina prolina indolacetato</p>

Tabla III. Resumen de las concentraciones relativas de metabolitos en tres de los grupos de estudio. Flechas rojas indican consumo. Flechas verdes indican producción del metabolito.

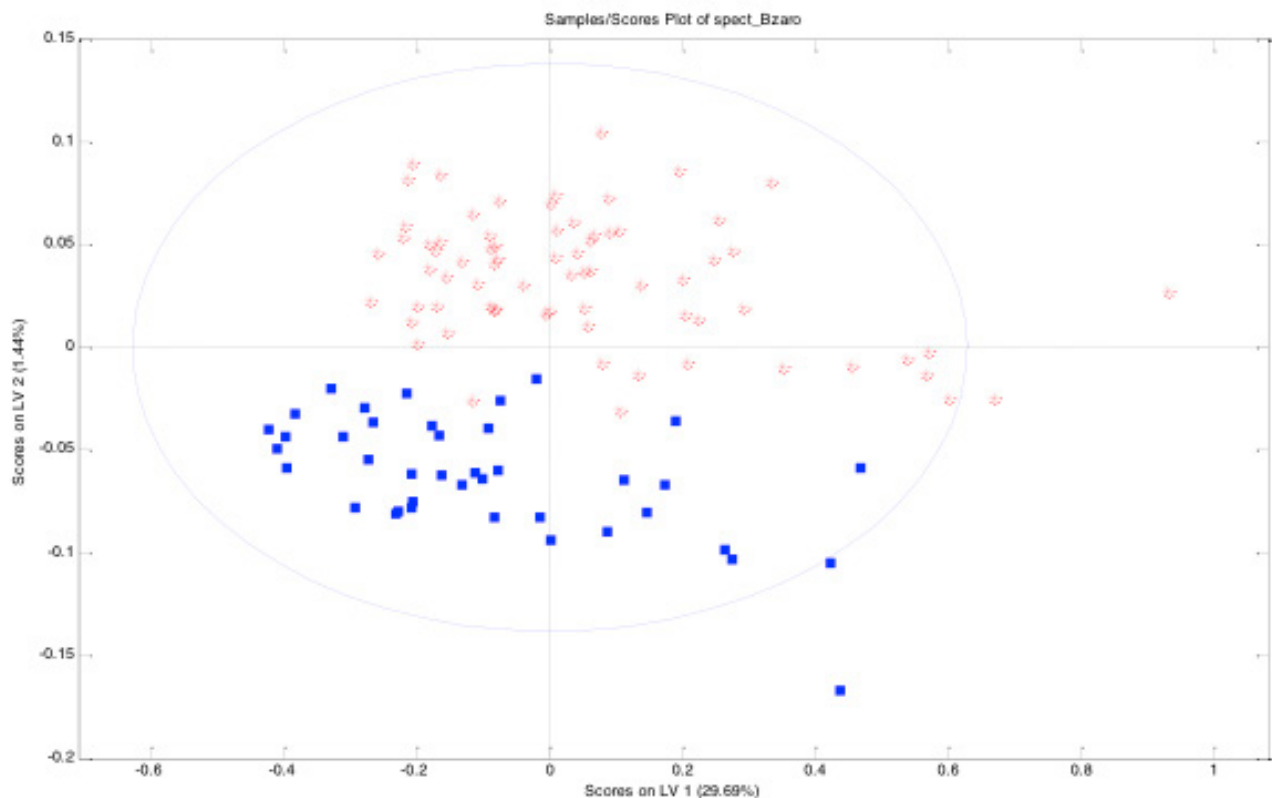


Figura 3.- Diagrama de puntuaciones del análisis PLS-DA donde se muestra el agrupamiento de las muestras procedentes de embriones que formaron blastocistos de buena calidad (azul) y los que no formaron blastocistos (rojo).

GENOTIPADO DEL SNP R72P DEL GEN P53 EN PACIENTES CON FALLO DE IMPLANTACIÓN Y ABORTO DE REPETICIÓN Y SU EFECTO EN LOS RESULTADOS DE LOS CICLOS DE FIV.

Belén Lledo⁽¹⁾; Azahara Turienzo⁽¹⁾; Jose A. Ortiz⁽¹⁾; Ruth Morales⁽¹⁾; Jorge Ten⁽²⁾; Joaquín Llacer⁽²⁾; Rafael Bernabeu^(1,2).

⁽¹⁾ INSTITUTO BERNABEU BIOTECH. Avda. Albufereta, 31. 03016. Alicante. España.

⁽²⁾ INSTITUTO BERNABEU. Avda. Albufereta, 31. 03016. Alicante. España.

blledo@institutobernabeu.com

INTRODUCCIÓN

Los abortos de repetición (RPL, *recurrent pregnancy loss*) se definen como la pérdida de tres o más embarazos consecutivos superiores a la semana 12. Recientemente la ASRM (Sociedad Americana de Medicina Reproductiva) ha ampliado dicha definición considerando que los abortos de embarazos no visualizados mediante ecografía (embarazos bioquímicos y/o de ubicación desconocida) deben incluirse en los abortos de repetición (Kolte *et al.*, 2014). En parejas sin problemas

de fertilidad los abortos se producen de forma espontánea en un 15-20% y sólo llega a convertirse en recurrente en 2-3% de esas parejas (Rai y Regan, 2006). Por otro lado, se considera un fallo repetido de implantación (RIF, *recurrent implantation failure*) cuando, después de un mínimo de tres ciclos fallidos de fecundación in vitro (FIV) en los que se transfirieron al menos cuatro embriones de buena calidad a una mujer de edad inferior a 40 años, no se consigue la implantación (Coughlan *et al.*, 2014).

Existe una larga serie de factores que pueden propiciar los RPL y los RIF, entre ellos factores anatómicos, endocrinos, inmunológicos, de coagulación y sobre todo genéticos, siendo este último el responsable del 50-60% de los casos, principalmente por alteraciones cromosómicas. Sin embargo, existe un porcentaje de casos de RPL y RIF de etiología desconocida. Recientemente se han identificado ciertas variantes genéticas (polimorfismos), así como factores ambientales y estilos de vida que predisponen a un mayor riesgo de sufrir dichas patologías.

La implantación embrionaria requiere de la capacidad del blastocisto de invadir el endometrio y de establecer su propia red vascular, así como una adecuada tolerancia inmunológica materna al embrión. La correcta invasión trofoblástica se consigue mediante un equilibrio entre procesos apoptóticos y de proliferación celular (Smith, 2000; Simon *et al.*, 2001). Un elevado número de proteínas están implicadas en la invasión del blastocisto y en la angiogénesis. Una de esas proteínas es p53, un potente supresor tumoral que induce la apoptosis y la angiogénesis (Savion *et al.*, 2000). Además, estudios demuestran que p53 interviene en la implantación **embrionaria mediada** por LIF (Factor inhibidor de leucemia) (Hu *et al.*, 2007). El gen *p53* (17p13) contiene 11 exones. Un SNP (polimorfismo de un único nucleótido) en el codón 72 que consiste en el cambio del alelo ancestral G por C da lugar a una prolina en lugar de una arginina. La proteína p53 con una arginina en posición 72 es marcadamente **más eficiente en inducir la apoptosis, la expresión de LIF y la transformación celular** (Pim y Banks, 2004). Una disminución de la expresión de los genes implicados en la apoptosis y la angiogénesis han sido asociados con RIF (Smith 2000).

Otra importante proteína implicada en la implantación es VEGF (Factor de crecimiento del endotelio vascular). VEGF es un factor angiogénico que actúa potenciando el crecimiento y remodelación vascular así como el incremento de la permeabilidad de los vasos, que es crucial para la implantación y posterior desarrollo de la placenta (Magdoud *et al.*, 2012). El gen *VEGF* (6p21) está organizado en 8 exones. Se han descrito varios SNP algunos de los cuales están asociados con una alteración en la expresión de VEGF. El SNP localizado en la región promotora -1154 posee un alelo con mayor frecuencia poblacional (G) que al verse sustituido (A) produce una menor expresión de VEGF (Watson *et al.*, 2000). Alteraciones en la expresión de VEGF en muestras deciduales de abortos tempranos (Vuroela *et al.*, 2000), así como la fertilidad comprometida en el ratón knock-out para VEGF (Rowe *et al.*, 2003) ponen de manifiesto la

importancia de VEGF en la implantación y las etapas tempranas del embarazo.

La correcta implantación y evolución del embarazo también depende de la inducción de tolerancia materna a los tejidos embrionarios y fetales. Un adecuado perfil de producción de citoquinas favorecerán el desarrollo fetal y placentario (Cha *et al.*, 2012). Numerosos estudios han tenido como objetivo averiguar el papel de cada citoquina durante el desarrollo embrionario, los cambios que sufren según la edad gestacional o las consecuencias que tiene una alteración en sus niveles para la implantación y el embarazo. La IL-10 es una citoquina antiinflamatoria que juega un papel fundamental en la tolerancia materno-fetal, niveles disminuidos de IL-10 están asociados a pérdidas de embarazo (Wang *et al.*, 2011). En el gen de la *IL-10* (1q31), el SNP en posición -1082A/G controla su expresión, produciendo el alelo A una disminución en la expresión del gen. Existen otras citoquinas que también son importantes para el mantenimiento del embarazo como la IL-11, que por el contrario que IL-10 es una citoquina inflamatoria con funciones similares a LIF. El gen de la *IL-11* se encuentra localizado en 19q13. Diferentes polimorfismos se han identificado en el gen de la *IL-11* segregando conjuntamente pudiendo afectar a la expresión del gen.

Finalmente, cabe la posibilidad que otras proteínas que no sean actores principales también puedan afectar a la adecuada implantación y desarrollo de la gestación. Como ejemplo, la apolipoproteína E (APOE) que está involucrada en el transporte de lipoproteínas, vitaminas solubles en lípidos y colesterol al sistema linfático y posteriormente al torrente sanguíneo (Mahley, et al., 2009). Una proteína defectuosa podría producir acumulación de lípidos en el torrente sanguíneo incrementando el riesgo trombótico. El gen ApoE (19q13) está formado por cuatro exones. Presenta tres isoformas polimórficas: ApoE E2 (cys 112, cys 158), ApoE E3 (cys 112, arg 158) y ApoE E4 (arg 112, arg 158) que producen seis diferentes genotipos: E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4 y

E4/E4. Diferentes genotipos se han asociado con problemas reproductivos principalmente RPL (Li *et al.*, 2014).

A partir de un estudio previo en el que evidenciamos que existía una asociación **entre el polimorfismo R72P** del gen p53 y pacientes RIF y RPL, nos planteamos como continuidad del trabajo obtener en la misma paciente un genotipo completo para las posibles variantes genéticas asociadas a RIF y RPL. De este modo conseguiremos conocer la prevalencia de los polimorfismos previamente descritos en los genes *p53*, *VEGF*, *IL-10*, *IL-11* y *APOE* en pacientes con RIF y RPL, con el fin de poder establecer un modelo que nos determine el riesgo a dichas patologías. Evaluando los resultados de los ciclos FIV de dichas pacientes podremos determinar el efecto de cada genotipo sobre el éxito de los ciclos.

MATERIAL Y MÉTODOS

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Los pacientes RPL y RIF fueron seleccionados de acuerdo a las definiciones actuales, descartando previamente en la pareja cualquier posible causa que explicara el RPL y RIF. Las muestras de ADN de las pacientes se extrajeron a partir de hisopo y/o muestra de sangre. Finalmente, se seleccionaron pacientes sin antecedentes de RIF o RPL de entre las donantes de ovocitos para ser usadas como controles.

Para evaluar la prevalencia y el efecto de los SNPs de los genes *p53*, *VEGF*, *IL-10*, *IL-11* y *APOE* en los pacientes RIF y RPL hemos diseñado un estudio retrospectivo de casos y controles. Se han seleccionado y genotipado un total de 255 pacientes ya diagnosticadas: 89 pacientes RPL, 77 pacientes RIF y 89 pacientes sin problemas de fertilidad. Del grupo de pacientes RIF y RPL se llevaron a cabo 76 ciclos de FIV (33 RPL y 43 RIF).

GENOTIPADO

Para el genotipado se empleó la técnica de PCR a tiempo real de discriminación alélica Taqman® **Life Technologies** (rs1042522 p53 R72P; rs1800896 IL-

11 -1082AG; rs1570360 VEGF -1154 AG; rs11668344 IL-10; rs429358 APOE R112C; rs7412 APOE R158C) siguiendo las instrucciones del fabricante.

ESTUDIO ESTADÍSTICO

Los resultados del genotipado fueron analizados usando SPSS v20.0 para determinar diferencias significativas entre los grupos de pacientes mediante la Chi-cuadrado de Pearson aceptando valores significativos $p < 0.05$. Para valorar el efecto de los polimorfismos en la tasa de embarazo, en el aborto bioquímico, el aborto clínico y el embarazo evolutivo se realizó una regresión logística.

RESULTADOS

Las frecuencias alélicas de las diferentes variantes genéticas en los grupos de pacientes estudiados se muestran en la Figura 1. De forma global se encuentran diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia del polimorfismo R72P del gen *p53* y en la isoforma E4 del gen *APOE* ($p < 0,05$) en pacientes RIF y RPL. Respecto al polimorfismo estudiado en VEGF e IL-11 se observa una tendencia a distribución diferente dentro del grupo de pacientes sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas. Finalmente, respecto al polimorfismo en IL-10 no se observan diferencias en la distribución de genotipos.

Analizando cada grupo de pacientes de forma independiente observamos que para las pacientes RPL el modelo recesivo del polimorfismo *p53* (RR/RP vs PP) y dominante de la IL-11 (AA/AG vs GG) están asociados con un mayor riesgo de sufrir abortos de repetición (Tabla I). En el caso de los pacientes RIF el modelo dominante del polimorfismo *p53* (RR vs RP/PP) y de VEGF (GG vs GA/AA) presenta una distribución diferente y por tanto se asocia con un mayor riesgo de sufrir fallos de implantación (Tabla II). A partir de estos resultados se puede diseñar un modelo de riesgo para RPL y RIF. El valor de área bajo la curva obtenido de los modelos es de 0,62 y 0,67 respectivamente y con especificidades del 75%. Dado que la edad incrementa el riesgo de dichas

patologías debido al efecto sobre las aneuploidías embrionarias incluir dicho parámetro al modelo lo mejoraría sustancialmente.

Por último, hemos valorado el impacto de las variantes genéticas que son de riesgo en cada uno de los grupos de pacientes y el resultado de los ciclos FIV. Observamos como en el grupo de pacientes RPL la beta positiva y la tasa de embarazo evolutivo es menor, así como la tasa de aborto es mayor en aquellas pacientes homocigotas para la prolina en posición 72 de la proteína *p53* y homocigotas GG en el polimorfismo de la IL-11. Respecto al polimorfismo APOE no se observaron diferencias en los resultados de los ciclos en pacientes RPL en función del genotipo E4. En cuanto al grupo de pacientes RIF, se obtienen mejores resultados en términos de beta positiva y embarazo evolutivo asociados a los polimorfismos de *p53* y VEGF.

DISCUSIÓN

Los abortos de repetición y los fallos de implantación son unos de los principales retos ante los que se enfrenta la medicina reproductiva, ya que son múltiples los factores que pueden provocarlos. Esto requiere de un abordaje multidisciplinar para el diagnóstico y tratamiento de estas parejas. Existe un porcentaje de pacientes con RPL y RIF en las que el diagnóstico y el pronóstico a partir de los conocimientos actuales son limitados, por ello cualquier aportación en este sentido abre nuevas esperanzas para ellas. La identificación de variantes genéticas que predisponen a RPL y RIF abre nuevas vías de investigación destinadas a mejorar el éxito reproductivo de estas pacientes.

En este trabajo hemos estudiado la prevalencia de ciertos polimorfismos genéticos en pacientes RPL y RIF con el objetivo de identificar posibles factores de riesgo. Nuestra investigación revela que el polimorfismo R72P en el gen *p53*, el GG en la IL-11 y la isoforma E4 en el gen APOE se encuentran con mayor prevalencia en los pacientes RPL. En el caso de los pacientes RIF además del polimorfismo *p53* también se observa una distribución diferente en relación a los controles en el

polimorfismo -1154 -AA/AG del gen VEGF. Además de las implicaciones directas sobre el diagnóstico que tienen estos resultados, también nos ponen de manifiesto que aunque estos dos tipos de patología comparten algunos aspectos en común hay factores que son totalmente diferentes que hacen que se tengan que tratar como entidades distintas.

La implantación embrionaria es un proceso complejo que requiere de un equilibrio perfecto entre mecanismos totalmente contrapuestos como son procesos apoptóticos y de proliferación celular así como fenómenos inflamatorios y antiinflamatorios que permitan una tolerancia inmunológica materno-fetal a la vez que una adecuada invasión tisular y angiogénesis. En estos procesos se requieren adecuados niveles de expresión de las proteínas implicadas en los diferentes mecanismos así como proteínas totalmente funcionales. De forma que cualquier variante podría alterar la implantación embrionaria y el desarrollo fetal.

Nuestros datos indican una asociación de la variante prolina en posición 72 de la proteína *p53* con RPL así como con RIF. El codón prolina en posición 72 da lugar a una proteína que induce altos niveles de arresto en G1 y, por tanto, una disminución de la proliferación celular (Hu *et al.* 2009), produciendo un inadecuado crecimiento trofoblástico dando lugar a RPL o RIF. Así mismo, *p53* regula la expresión de LIF importante para la adecuada receptividad endometrial. La variante prolina en posición 72 posee una menor capacidad de inducir la expresión de LIF, bajos niveles de LIF producen menores tasas de implantación (Kang *et al.*, 2009).

La correlación observada en nuestros pacientes con la variante E4 del gen APOE coincide con resultados previos recogidos en diferentes meta-análisis (Li *et al.*, 2014). El incremento del riesgo trombotico producido por la variante E4 así como una disminución de las citoquinas inflamatorias podría explicar la etiología de la relación entre la variante E4 del gen APOE y el RPL (Korkmazer *et al.*, 2013). Las citoquinas, así como, los factores

angiogénicos juegan un papel relevante en la modular la inmunotolerancia materno-fetal y el establecimiento de la red vascular, respetivamente. Las variantes genéticas asociadas a modificar la expresión de los genes que codifican dichas proteínas afectarán a los niveles de las mismas y, por tanto, a los mecanismos asociados a ellas. En este sentido el polimorfismo asociado al gen de la IL-11 (Saxena *et al.*, 2015) así como el de VEGF (Magdoud *et al.*, 2012), produciría niveles insuficientes que provocarían dificultades para la implantación embrionaria o el mantenimiento del embarazo.

Como conclusión, este trabajo ha identificado variantes genéticas asociadas al RIF y RPL. Además, tras el análisis de los resultados de los ciclos de dichas pacientes podemos añadir a nuestras conclusiones que las pacientes portadoras de los genotipos de riesgo poseen menos probabilidades de conseguir un embarazo evolutivo. Esta información junto con marcadores adicionales podría permitir desarrollar test diagnósticos para detectar el riesgo de RIF y RPL y establecer el pronóstico del ciclo antes que el tratamiento se inicie.

BIBLIOGRAFIA

- Cha J, Sun X, Dey SK. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med.* 2012;18:1754–1767.
- Coughlan C, Ledger W, Wang Q, Liu F, Demiroglu A, Gurgan T, Cutting R, Ong K, Sallam H, Li TC. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod Biomed Online.* 2014; 28:14–38.
- Hu W, Feng Z, Teresky AK, Levine AJ. p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature.* 2007. 450:721–4.
- Hu W, Feng Z, Levine AJ. The regulation of human reproduction by p53 and its pathway. *Cell cycle.* 2009; 15:3621–2.
- Kang HJ, Feng Z, Sun Y, Atwal G, Murphy ME, Rebbeck TR, Rosenwaks Z, Levine AJ, Hu W. Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106:9761–6.
- Kolte AM, van Oppenraaij RH, Quenby S, Farquharson RG, Stephenson M, Goddijn M, Christiansen OB; ESHRE Special Interest Group Early Pregnancy. Non-visualized pregnancy losses are prognostically important for unexplained recurrent miscarriage. *Hum Reprod.* 2014; 29:931–937.
- Korkmazer E, Ustunyurt E, Tekin B, Cilingir O. Study on potential role of apolipoprotein E in recurrent pregnancy loss. *Exp Ther Med.* 2013; 5:1408–1410.
- Li J, Chen Y, Wu H, Li L. Apolipoprotein E (Apo E) gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet.* 2014;31:139–48.
- Mahley RW, Weisgraber W, Karl H, Huang, Yadong. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *Journal of lipid research*, 2009, vol. 50, no Supplement, p. S183–S188.
- Magdoud K, Dendana M, Herbein V, Hizem S, Ben Jazia K, Messaoudi S, Almawi WY, Touraine R, Mahjoub T. Identification of specific vascular endothelial growth factor susceptible and protective haplotypes associated with recurrent spontaneous miscarriages. *Hum Reprod.* 2012; 27:1536–41.
- Pim D, Banks, L. p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int J Cancer.* 2004; 108: 196–9.
- Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage. *Lancet.* 2006; 368:601–11.
- Rowe AJ, Wulff C, Fraser HM. Localization of mRNA for vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietins and their receptors during the peri-implantation period and early pregnancy in marmosets (*Callithrix jacchus*). *Reproduction.* 2003 Aug;126:227–38.
- Savion S, Lepsky E, Orenstein H, Carp H, Shepshelovich J, Torchinsky A, Fein A, Toder V. Apoptosis in the uterus of mice with pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol.* 2002; 47:118–27.
- Saxena R, Bjonnes AC, Georgopoulos NA, Koika V, Panidis D, Welt CK. Gene variants associated with age at menopause are also associated with polycystic ovary syndrome, gonadotrophins and ovarian volume. *Hum Reprod.* 2015;30:1697–703.
- Simón C, Dominguez F, Remohí J, Pellicer A. Embryo effects in human implantation: embryonic regulation of endometrial molecules in human implantation. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 943:1–16.
- Smith SK. Angiogenesis and implantation. *Hum Reprod.* 2000; 15 Suppl 6:59–66.
- Vuorela P, Carpén O, Tulppala M, Halmesmaki E. VEGF, its receptors and the tie receptors in recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod.* 2000;6:276–82.
- Wang WJ, Hao CF, Lin QD. Dysregulation of macrophage activation by decidual regulatory T cells in unexplained recurrent miscarriage patients. *J Reprod Immunol.* 2011;92:97–102.
- Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ and Brenchley PE. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine.* 2000;12:1232–123.

Tabla 1

	p53		IL-11		APOE	
	RR/RP	PP	AA/AG	GG	E4E2/E4E4/E4E3	E2E2/E2E3/E3E3
CONTROL (%)	93,3	6,7	93,3	6,7	86,5	13,5
RPL (%)	86,5	13,5	86,5	13,5	70,8	25,8

Tabla 2

	p53		IL-11		APOE	
	RR/RP	PP	AA/AG	GG	E4E2/E4E4/E4E3	E2E2/E2E3/E3E3
CONTROL (%)	93,3	6,7	93,3	6,7	86,5	13,5
RPL (%)	86,5	13,5	86,5	13,5	70,8	25,8

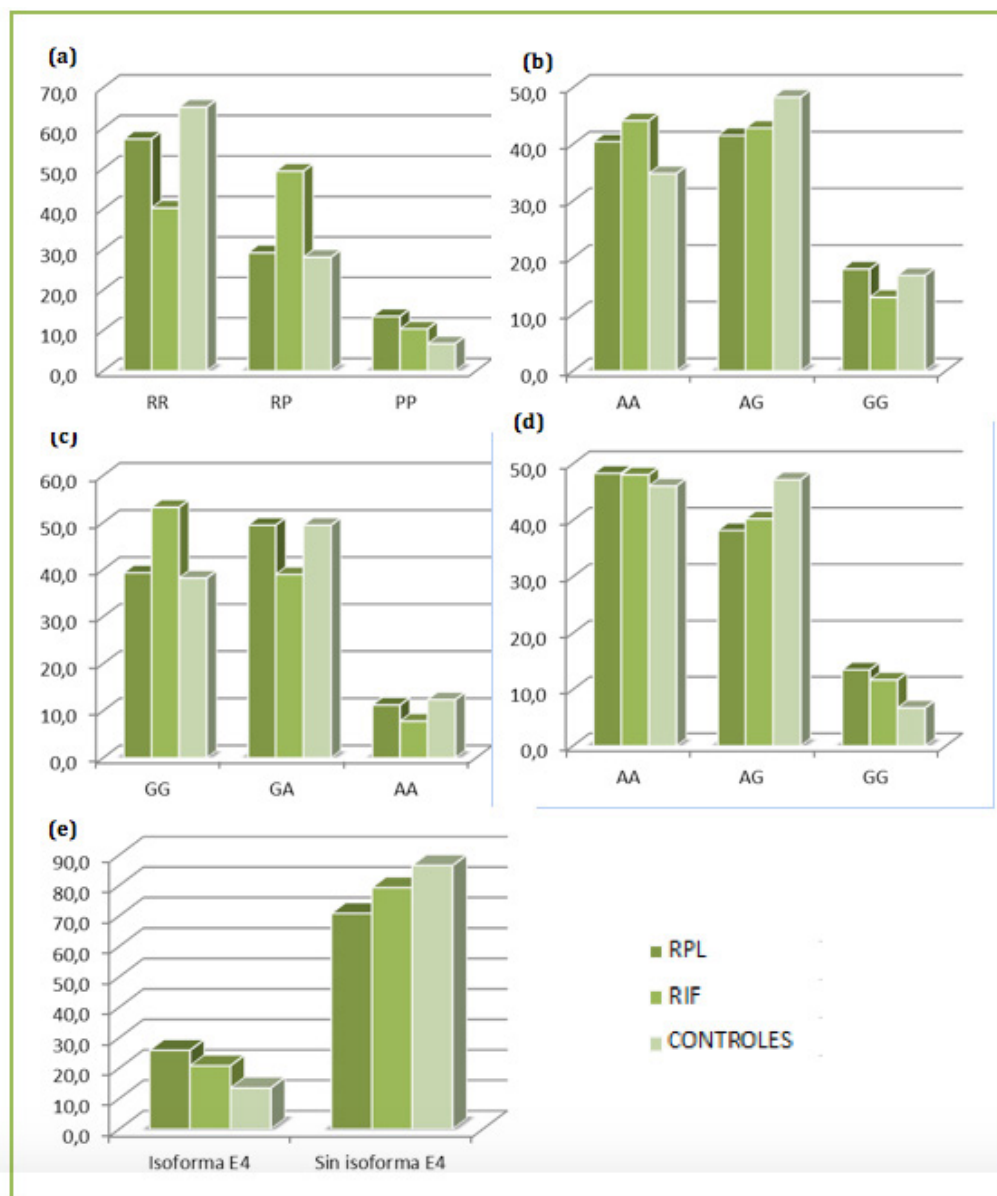


Figura 1. Distribución de la prevalencia de los polimorfismos en los genes: p53 (a), IL-10 (b), VEGF (c), IL-11 (d), APOE (e).

Microscopio invertido IX73, flexible, ergonómico y fácil de usar.



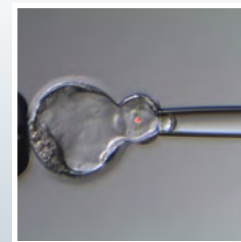
Alarma



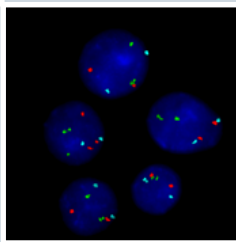
Time-lapse



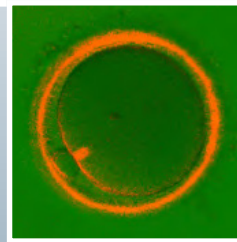
Biopsia TFE



IMSI



FISH



Polarización

Think Quality

- **Herramientas de precisión**
Sistemas de microscopía para observación y micromanipulación
- **Control permanente de parámetros**
Condiciones de cultivo estables en un entorno controlado
- **Selección de los mejores candidatos**
Evaluación de la calidad oocitaria y del espermatozoides, y selección de los mejores embriones
- **Mejores decisiones**
Haga un mejor análisis teniendo toda la información

OLYMPUS

Your Vision, Our Future

EPIGENÉTICA Y REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Cristina Camprubí Sánchez
GenIntegral, Cardedeu, Barcelona
cristina.camprubi.lab@gmail.com

EPIGENÉTICA

El término epigenética fue utilizado ya en los años 1950's por **Conrad Hal Waddington** (1905- 1975), biólogo del desarrollo, genetista, embriólogo y uno de los fundadores de la biología de sistemas (Waddington, 1957). Waddington ilustró la metáfora del **paisaje epigenético** con el que representaba la diferenciación celular y el desarrollo embrionario con una bola en la cima de una ladera montañosa con crestas y valles (Figura 1). La bola representa el estado de totipotencia y según ésta avance por los valles o creos irá adquiriendo las características celulares y diferenciales de un tejido u órgano. Waddington representó esta ilustración considerando que el inicio del desarrollo es plástico, de modo que la bola puede iniciar diferentes recorridos a lo largo de la ladera, pero irreversible una vez la bola inicia y/o recorre uno de los caminos, sin poder volver atrás ni modificar el camino.

El **término epigenética**, que Waddington utilizó para proponer un modelo, en el que el desarrollo y la expresión de un fenotipo se concebía mediante la "conversación" o interacción entre la información genética y el ambiente, **en la actualidad se define comúnmente como** "los cambios heredables en la función génica que se producen sin modificar la secuencia de nucleótidos del ADN". Estos cambios se corresponden con modificaciones covalentes reversibles en el DNA e histonas que actúan conjuntamente modificando la conformación de la cromatina y regulando la expresión génica. Incluyen la metilación del DNA en el carbono 5 de la base citosina (5-metilcitosina; 5mC) en dinucleótidos CpG y modificaciones postraduccionales en los extremos N-terminales de las histonas. Además de estas modificaciones epigenéticas más conocidas, más recientemente han sido

descritas otro tipo de modificaciones también presentes en las bases C del DNA, la 5-hidroximetilcitosina (5hmC), la 5-formilcitosina (5fC) y la 5-carboxilcitosina (5caC) (Tahiliani et al., 2009; Ito et al., 2010; Ito et al., 2011).

MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS

De forma genérica, la adición de grupos acetilo por las proteínas HAT (*Histone acetyltransferases*) en determinados aminoácidos de determinadas proteínas histonas conlleva la adopción de la conformación de eucromatina (conformación abierta; potencialmente activa). La heterocromatina (conformación cerrada; transcripcionalmente inactiva) se asocia a la deacetilación de histonas por las proteínas HDACs (*Histone deacetylases*), a la metilación del DNA por las proteínas DNMTs (*DNA methyltransferases*) y a la adición de también grupos metilo en determinados aminoácidos de histonas concretas, catalizada por las proteínas HMTs (*Histone Methyltransferases*). Aunque comúnmente y de forma generalizada o resumida la metilación en las histonas suele describirse como una modificación represora, es importante remarcar que según en qué aminoácido del extremo N-terminal de qué histona (H2A, H2B, H3, H4) y el número de grupo metilos que presente, la metilación se corresponderá con una modificación represora o activadora (Bannister and Kouzarides, 2011).

La metilación del DNA en regiones promotoras de genes se asocia a inactivación o represión de la expresión génica. En cambio, la 5hmC es una modificación epigenética activadora además de ser el producto resultante de la oxidación de la 5mC. La oxidación de la 5mC en 5hmC es catalizada por las proteínas TET (*Ten Eleven Translocation*

proteins) encargadas de las primeras etapas del proceso de demetilación del DNA, por ejemplo en procesos de reprogramación epigenética. La oxidación de la 5hmC genera 5fC y la 5caC se obtiene de la oxidación de la 5fC. Las modificaciones 5fC y 5caC son reclutadoras de la maquinaria de reparación del DNA por escisión de bases (*Base excision Repair; BER*). Con la actividad BER se eliminan las bases modificadas 5fC y 5caC que son substituidas por nuevas bases C libres de modificaciones o demetiladas (Revisado por Delatte et al., 2014 y Breiling and Lyko, 2015).

Las **modificaciones epigenéticas regulan la expresión génica y explican** las diferencias fenotípicas que presentan individuos genéticamente idénticos, así como las diferencias morfológicas y funcionales entre diferentes tipos celulares. Mediante tecnología de análisis masivo de metilación del DNA, ha sido demostrado que gemelos monozigóticos difieren en los perfiles de metilación del DNA, extrapolándose a diferencias en la expresión génica. Estas diferencias se acusan con la edad y exposición diferencial de los individuos a factores ambientales. La variabilidad en la expresión explica características fenotípicas, como pueden ser diferencias en la susceptibilidad a desarrollar determinadas enfermedades como desarrollo de cáncer e incluso enfermedades autoinmunes (Kaminsky et al., 2009). Por otro lado, la diferenciación celular está estrechamente ligada a modificaciones epigenéticas. A partir del cigoto y de las células totipotentes, resultantes de las primeras divisiones embrionarias, se obtienen los tejidos extraembrionarios y todos los tipos celulares del organismo que presentarán sus patrones epigenéticos característicos, surgidos durante el desarrollo.

REPROGRAMACIÓN EPIGENÉTICA EN EMBRIONES PREIMPLANTACIONALES

Como cualquier célula del organismo, ovocitos y espermatozoides presentan sus patrones epigenéticos específicos de identidad y función celular. Después de la fecundación, estos patrones epigenéticos son reprogramados en los primeros estadios del desarrollo embrionario, de modo que las células resultantes de las primeras divisiones mitóticas del embrión son células totipotentes, pudiendo dar lugar tanto a los componentes embrionarios como extraembrionarios. En etapas posteriores (a partir de blastocisto), comenzarán a surgir patrones epigenéticos de células pluripotentes que definirán el trofoectodermo y la masa celular interna, cuyas células pueden dar lugar a cualquiera de los tres linajes embrionarios (endodermo, ectodermo y mesodermo) y así, progresivamente durante el desarrollo, surgen los patrones epigenéticos que irán definiendo tipos celulares, tejidos y órganos.

La demetilación del genoma materno y paterno en embriones preimplantacionales es asincrónica. El genoma paterno pierde metilación por la acción de las proteínas TET (en concreto la proteína TET3), las cuales, durante el desarrollo embrionario temprano, actúan específicamente sobre el genoma paterno causando su demetilación activa (ver sección Modificaciones epigenéticas). Por otro lado la proteína STELLA/DPPA3 (también conocida como PGC7) se encarga de proteger el genoma materno de la acción de las proteínas TET y la demetilación de éste se da de un modo pasivo, perdiéndose a lo largo de las sucesivas replications del DNA, consecuencia de la inactividad de las proteínas DNMTs (Iqbal et al., 2011; Wossidlo et al., 2011; Seisenberger et al., 2013).

IMPRONTA GENÓMICA

El término epigenética engloba la impronta genómica (imprinting en inglés), un sistema de regulación de la expresión génica presente en especies de gestación intrauterina, que consiste en marcar diferencialmente

con modificaciones epigenéticas determinados genes en función de su origen parental, de manera que sólo se expresa el alelo materno o paterno (expresión monoalélica). Actualmente se conocen aproximadamente un centenar de genes regulados por impronta genómica en humanos, mapados en diversos cromosomas y cuya función y regulación es importante para el correcto desarrollo neurológico, embrionario y de los tejidos extraembrionarios. Una característica importante de la impronta genómica es que, a pesar de la flexibilidad epigenética que permite la diferenciación celular, los patrones epigenéticos que controlan la expresión monoalélica de los genes regulados por impronta genómica son, en términos generales, comunes en todos los tipos celulares. Simplificando el concepto, si consideramos sólo uno del total de genes regulados por impronta genómica conocidos hasta la actualidad, si para ese gen en concreto es específicamente el alelo paterno el activo, ese gen presentará modificaciones epigenéticas activadoras en el alelo paterno y represoras en el materno en todas las células del organismo independientemente del tejido o tipo celular. Con ello, en aquel tipo celular o tejido en el que este gen sea transcripcionalmente activo, se obtendrá su transcrito solo a partir del alelo paterno.

Reprogramación epigenética en las células germinales primordiales.

Para evitar la presencia de fenotipos anómalos en la descendencia, causados por la expresión bialélica o la expresión nula de genes regulados por impronta genómica, ésta debe mantenerse inalterable durante el periodo de reprogramación epigenética que permite la dediferenciación y posterior diferenciación durante la embriogénesis, contribuyendo al correcto desarrollo embrionario y de tejidos extraembrionarios y neurológico. En cambio sí debe reprogramarse en la línea germinal. Tal como se ha indicado en la sección anterior, los patrones epigenéticos que controlan la expresión monoalélica de genes regulados por impronta genómica son comunes en todos los tipos celulares.

La excepción son las células germinales primordiales (Primordial Germ Cells; PGCs). El ciclo de reprogramación en línea germinal evita que el 50% de los gametos haploides, procedentes de las PGCs diploides, sean portadores de la copia metilada y el otro 50% sean portadores de la no metilada. Esta situación podría dar lugar a fenotipos anómalos en la descendencia o problemas graves del desarrollo en caso que la fecundación tuviera lugar entre gametos portadores ambos de mismo patrón epigenético activador o represor para uno o varios genes regulados por impronta genómica. Para evitar esta situación, durante la migración de las PGCs a los puentes genitales en periodo fetal, la metilación del DNA de genes regulados por impronta genómica se borra por la acción de las proteínas TET (concretamente de las proteínas TET1 y TET2) y la conversión de las 5mC en 5hmC (Hackett et al., 2013). Pero la reprogramación epigenética en las PGCs no solo afecta a los genes regulados por impronta genómica. Durante la migración de las PGCs procedentes del epiblasto a los puentes genitales en las primeras semanas de gestación, la reprogramación epigenética del genoma de éstas es también crucial para conferirles totipotencia y es crítico para el posterior desarrollo embrionario (Hackett et al., 2013; Tang et al., 2015).

Posteriormente, durante la gametogénesis se adquieren los patrones epigenéticos correspondientes y en función del sexo, los genes regulados por impronta genómica establecen los patrones de metilación específicos de alelo. Así, los genes con metilación materna, establecerán dicha metilación durante la maduración ovocitaria (Sato et al., 2007) en todos los ovocitos, mientras que en la espermatogénesis dichos genes se mantendrán desmetilados; los genes con metilación paterna la establecerán durante la espermatogénesis, de modo que todos los espermatozoides sean portadores de la copia inactiva o metilada y los ovocitos de la copia activa o no metilada. En humanos el establecimiento de la impronta paterna se considera completa en las espermatogonias del individuo adulto (Kerjean et al., 2000).

HERENCIA EPIGENÉTICA

Las proteínas encargadas de la metilación de novo del DNA son las DNMT3. Las proteínas DNMT1 son consideradas de mantenimiento de la metilación del DNA durante la mitosis, ya que reconocen el DNA hemimetilado después de cada replicación y metilan la nueva cadena complementaria. Estas proteínas no actúan en los primeros estadios del desarrollo embrionario y por ello el genoma materno es demetilado de forma pasiva después de la fecundación (ver sección Reprogramación epigenética en embriones preimplantacionales). En relación a las modificaciones epigenéticas presentes en los genes regulados por impronta genómica establecidas durante la meiosis, éstas estarán presentes en el cigoto y se transmitirán a todas las células durante la mitosis mediante la acción específica de las DNMT1 en estos loci. Es decir, las mismas modificaciones presentes en la cromatina molde serán incorporadas al DNA recién replicado así como a las proteínas histonas con las que éste se ensamble. Del mismo modo, en el resto del genoma, una vez establecidos los patrones epigenéticos específicos de linaje celular, éstos también se mantienen durante la mitosis o generación de células hijas.

Si se considera que en las PGCs y durante el desarrollo embrionario temprano se da la reprogramación epigenética del genoma (sin considerar el centenar de genes regulados por impronta genómica), podría asumirse que pueda no existir herencia epigenética transgeneracional. Cabe comentar que la demetilación de los genomas parentales y especialmente el de las PGCs no es absoluta (Tang et al., 2015). Así, los factores intrínsecos y/o extrínsecos o ambientales que pueden influir en la epigenética de un individuo a nivel somático (ver sección siguiente *Epigenética y reproducción asistida*), también pueden influir en sus células de la línea germinal, afectando a regiones del genoma que no son reprogramadas después de la fecundación. Por tanto, sí pueden ser transmitidas a la descendencia variaciones o anomalías epigenéticas

presentes en los progenitores (Pembrey et al., 2014). En el caso de gestantes expuestas a agentes que influyen en la epigenética, las posibles variaciones o anomalías, pueden además ser heredadas por generaciones posteriores si éstas afectan a la línea germinal del feto además de al propio feto a nivel somático.

EPIGENÉTICA Y REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Tanto la metilación del DNA como las modificaciones en las proteínas histonas son sensibles a factores intrínsecos y extrínsecos o ambientales (Jirtle, 2014; Pembrey et al., 2014), siendo susceptibles a presentar variaciones y/o anomalías causadas por: factores genéticos (mutaciones o polimorfismos en los genes que codifican enzimas de la ruta metabólica de obtención de grupos metilo o en el establecimiento y/o mantenimiento de la metilación) (Zogel et al., 2006; Kobayashi et al., 2009); exposición a toxinas (Anway and Skinner, 2008); tratamientos hormonales (Pathak et al., 2009; Pathak et al., 2010); factores ambientales intrauterinos (Lim and Ferguson-Smith, 2010); diferencias dietéticas (Waterland and Jirtle, 2003; Dolinoy et al., 2006; Chmurzynska, 2010).

El conocimiento de los mecanismos y las etapas de reprogramación epigenética en embriones y en PGCs, así como la susceptibilidad de la epigenética y por tanto de la impronta genómica a factores ambientales, metabólicos y genéticos, ha focalizado en la última década la investigación de la posible relación de la epigenética e impronta genómica con la infertilidad y reproducción asistida (Revisado por Camprubí C, 2010; van Montfoort et al., 2012). Concretamente, se han realizado estudios tanto epidemiológicos, en la población de afectados de síndromes causados por anomalías en regiones del genoma reguladas por impronta, como experimentales, con el objetivo de responder a determinadas cuestiones como: ¿existe un riesgo incrementado de transmitir anomalías epigenéticas a la descendencia concebida con técnicas de reproducción asistida (TRA)?; ¿la estimulación ovárica puede

interferir en el establecimiento de la impronta genómica en ovocitos?; ¿el cultivo in vitro de embriones fuera del ambiente intrauterino puede interferir en el mantenimiento de la impronta genómica y/o en la reprogramación epigenética?; ¿anomalías epigenéticas presentes en gametos pueden explicar determinados casos de infertilidad? Y en el caso de anomalías epigenéticas no viables ¿podrían éstas explicar casos de bloqueo en el desarrollo embrionario y/o de tejidos extraembrionarios y comprometer el éxito del ciclo de reproducción asistida?

En la última década diversos **estudios epidemiológicos** en población de afectados de síndromes causados por anomalías en regiones genómicas reguladas por impronta (principalmente Síndrome de Beckwith-Wiedemann – SBW– y Síndrome de Angelman –SA–) avalan un incremento moderado de éstos síndromes en niños concebidos mediante TRA (Cox et al., 2002; Ørstavik et al., 2003; DeBaun et al., 2003; Maher et al., 2003; Gicquel et al., 2003; Halliday et al., 2004; Kallen et al., 2005; Sutcliffe et al., 2006; Doornbos et al., 2007; Lim et al., 2009; Kallen et al., 2010; Viot et al., 2010; Whitelaw et al., 2014). Algunos autores describen riesgos incrementados del orden de 3X a 16X, considerando la frecuencia relativa del síndrome en la población concebida por reproducción asistida y comparándola con su incidencia en la población general. También basan sus conclusiones en que son síndromes de muy baja incidencia en la población y en que la causa en todos los casos descritos concebidos por TRA coincide en ser anomalías en la impronta, aun siendo la etiología o causa menos frecuente del síndrome (inferior a la frecuencia de deleciones de la región crítica, disomías uniparentales o mutaciones genéticas en el alelo activo). Aunque estos trabajos apuntan un incremento moderado del riesgo de transmitir anomalías epigenéticas, no permiten conocer si éstas pueden ser consecuencia de las técnicas o de la infertilidad.

Dado que el patrón de metilación alelo específico en los loci regulados por impronta genómica es conocido, la

mayoría de trabajos experimentales se han centrado en el estudio de la metilación del DNA en regiones reguladas por impronta mediante tecnologías locus específicas. Los resultados de estos trabajos indican que el cultivo in vitro de embriones (Fernández-González et al., 2007; Market-Velker et al., 2010a), la maduración in vitro de ovocitos (Sato et al., 2007) o los procesos de estimulación ovárica (Sato et al., 2007; Market-Velker et al., 2010b), pueden interferir en la impronta genómica. Adicionalmente a los estudios experimentales, los resultados de estudios en población SBW concebida mediante inseminación con estimulación con gonadotropinas o sólo con medicación, también señalan a los tratamientos hormonales como posibles causantes de las anomalías epigenéticas presentes en la descendencia (Chang et al., 2005; Sutcliffe et al., 2006; Doornbos et al., 2007), además de inducir a algunos autores a considerar la infertilidad como posible causa (Doornbos et al., 2007).

Son diversas las publicaciones que avalan una relación entre la reproducción asistida y anomalías en la impronta en la descendencia. En este sentido, Nelissen y colaboradores identificaron niveles de metilación del DNA reducidos en dos loci regulados por impronta genómica en placentas de gestaciones TRA, correlacionándose con diferencias de expresión (Nelissen et al., 2013). Sin embargo, nuestros resultados del estudio en placentas de la metilación del DNA de todas las regiones del genoma reguladas por impronta genómica conocidas hasta la actualidad, sugiere que las TRA *per se* no parecen ser suficientes para explicar los incrementos en el riesgo de anomalías en la impronta en la descendencia dado que los niveles de metilación fueron los esperados y pudimos confirmar la correcta expresión monoalélica (Camprubí et al., 2013). Adicionalmente nuestros resultados avalan que ni la restricción del crecimiento intrauterino ni la prematuridad tengan relación con anomalías en la impronta, tanto en gestaciones TRA como en gestaciones espontáneas (Camprubí et al., 2013).

En el contexto concreto de la infertilidad, anomalías genéticas o cromosómicas explican casos de bloqueo meiótico, por lo que es lógico plantear la hipótesis que anomalías epigenéticas puedan explicar casos de infertilidad idiopática. Este planteamiento no puede ser demostrado experimentalmente en el caso de la meiosis femenina por la limitación de obtener ovocitos sin estimulación. Aún así, con datos epidemiológicos obtenidos de madres de pacientes SA causado por anomalía en la impronta, Ludwig y colaboradores demostraron una correlación entre infertilidad y la presencia de estas anomalías en la descendencia (Ludwig et al., 2005). En el caso de la meiosis masculina, son múltiples los trabajos experimentales que confirman la relación entre de anomalías en la metilación de genes regulados por impronta e infertilidad masculina (Marques et al., 2004; Kobayashi et al., 2007; Marques et al., 2008; Kobayashi et al., 2009; Marques et al., 2010; Poplinski et al., 2010; Boissonnas et al., 2010; Minor et al., 2011; Pladevall, 2011; El Hajj et al., 2011; Camprubí et al., 2012). Sin embargo, dichas anomalías no están presentes en la totalidad de la población celular y no parecen condicionar los tratamientos de reproducción asistida al que se someten las parejas (Pladevall, 2011; El Hajj et al., 2011; Camprubí et al., 2012).

En el año 2011, El Hajj y colaboradores describieron anomalías en la metilación de regiones ALU de DNA repetitivo en espermatozoides, además de en genes regulados por impronta, poniendo de manifiesto la posibilidad de una asociación entre infertilidad y anomalías en la metilación de forma más generalizada (El Hajj et al., 2011). Las **estrategias de análisis de la metilación del DNA a gran escala** de reciente desarrollo, son aplicables al estudio de la infertilidad masculina. El uso de estas metodologías en el último lustro, despunta con unos primeros resultados que avalan la presencia de anomalías en la metilación del DNA en espermatozoides de individuos infértiles que van más allá de las regiones reguladas por impronta (Pacheco et al., 2011; Aston et al., 2012; Heyn et al., 2012; Schütte

et al., 2013; Friemel et al., 2014; Urdinguio et al., 2015; Camprubí et al., *Manuscript submitted for publication*). Adicionalmente, en nuestro trabajo en particular, hemos podido relacionar variaciones en la metilación del DNA con la edad, el seminograma, la estabilidad cromosómica y los datos clínicos del ciclo de reproducción (Camprubí et al., *Manuscript submitted for publication*). La relación de las anomalías en la metilación con la infertilidad masculina apunta a adquirir relevancia, pero la relación directa de estos hallazgos con la presencia de anomalías epigenéticas en la descendencia es dependiente de estudios poblacionales en la descendencia de TRA a largo plazo, a gran escala y complejos. Aunque no asociados a infertilidad, son en este sentido inquietantes unos primeros resultados que recientemente han descrito variaciones en la metilación del DNA en espermatozoides de padres de afectos de autismo (Feinberg et al., 2015).

El hecho que la metilación del DNA es susceptible a factores intrínsecos y extrínsecos, podría llevar a la premisa conceptual de que el epigenoma podría presentar una variación interindividual también compleja que dificulte extrapolar resultados experimentales a anomalía o normalidad. Las nuevas tecnologías de análisis de la metilación del genoma completo están siendo aplicadas para definir el epigenoma de diferentes tipos celulares (Roadmap Epigenomics Consortium, 2015). Entre otros, se ha aplicado recientemente para analizar y describir el metiloma del espermatozoide, (Krausz et al., 2012; Camprubí et al., *Manuscript in preparation*) el cual resulta muy homogéneo. Su aplicación para el estudio del metiloma/epigenoma de embriones y ovocitos presenta actualmente limitaciones debido a la cantidad de DNA necesaria para llevar a cabo la metodología (McGraw et al., 2013). El desarrollo de estrategias que permitan superar estas barreras aportará herramientas para el estudio del epigenoma de células germinales y embriones preimplantacionales, cuyos resultados se intuyen reveladores en la investigación de la infertilidad y en los avances en reproducción asistida.

BIBLIOGRAFÍA

- Anway MD, Skinner MK. Epigenetic programming of the germ line: effects of endocrine disruptors on the development of transgenerational disease. *Reprod Biomed Online* 2008; 16(1):23-5.
- Aston KI, Punj V, Liu L, Carrell DT. Genome-wide sperm deoxyribonucleic acid methylation is altered in some men with abnormal chromatin packaging or poor in vitro fertilization embryogenesis. *Fertil Steril* 2012; 97:285-292.
- Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 2011;21(3):381-95.
- Boissonnas CC, Abdalaoui HE, Haelewyn V, Fauque P, Dupont JM, Gut I, et al. Specific epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men. *Eur J Hum Genet* 2010; 18(1):73-80.
- Breiling A, Lyko F. Epigenetic regulatory functions of DNA modifications: 5-methylcytosine and beyond. *Epigenetics Chromatin* 2015;21;8:24.
- Camprubí C. Impronta genómica y reproducción asistida. *ASEBIR* 2010; 15(1):36-41.
- Camprubí C, Pladevall M, Grossmann M, Garrido N, Pons MC, Blanco J. Semen samples showing an increased rate of spermatozoa with imprinting errors have a negligible effect in the outcome of assisted reproduction techniques. *Epigenetics* 2012; 7(10):1115-24.
- Camprubí C, Iglesias-Platas I, Martín-Trujillo A, Salvador-Alarcon C, Rodríguez MA, Barredo DR, et al. Stability of genomic imprinting and gestational-age dynamic methylation in complicated pregnancies conceived following assisted reproductive technologies. *Biol Reprod* 2013; 89(3):50.
- Camprubí C, Salas-Huetos A, Aiese-Cigliano R, Godo A, Pons MC, Castellano G, et al. Sperm DNA methylation and its association with age, seminal parameters, chromosome stability and ART outcome: an array-based analysis. *Manuscript submitted for publication*.
- Camprubí C, Salas-Huetos A, Aiese-Cigliano R, Sanseverino W, Garrido N, Blanco J. What the sperm methylome tell us. *Manuscript in preparation*.
- Chang AS, Moley KH, Wangler M, Feinberg AP, Debaun MR. Association between Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproductive technology: a case series of 19 patients. *Fertil Steril* 2005; 83:349-354.
- Chmurzynska A. Fetal programming: link between early nutrition, DNA methylation, and complex diseases. *Nutr Rev* 2010; 68(2):87-98.
- Cox GF, Bürger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu BL, Horsthemke B. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* 2002; 71(1):162-164.
- DeBaun MR, Niemitz EL, Feinberg AP. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet* 2003; 72:156-160.
- Delatte B, Deplus R1, Fuks F. Playing TETris with DNA modifications. *EMBO J* 2014;33(11):1198-211.
- Dolinoy DC, Weidman JR, Waterland RA et al. Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse Offspring from obesity by modifying the fetal epigenome. *Environ Health Perspect* 2006; 114(4):567-572.
- Doornbos ME, Maas SM, McDonnell J, Vermeiden JP, Hennekam RC. Infertility, assisted reproduction technologies and imprinting disturbances: a Dutch study. *Hum Reprod* 2007; 22:2476-2480.
- El Hajj N, Zechner U, Schneider E, Tresch A, Gromoll J, Hahn T, Schorsch M, Haaf T. Methylation status of imprinted genes and repetitive elements in sperm DNA from infertile males. *Sex Dev* 2011; 5(2):60-9.
- Feinberg JI, Bakulski KM, Jaffe AE, Tryggvadottir R, Brown SC, Goldman LR, et al. Paternal sperm DNA methylation associated with early signs of autism risk in an autism-enriched cohort. *Int J Epidemiol* 2015 Apr 14. pii: dyv028. [Epub ahead of print].
- Fernández-Gonzalez R, Ramirez MA, Bilbao A, De Fonseca FR, Gutiérrez-Adán A. Suboptimal in vitro culture conditions: an epigenetic origin of long-term health effects. *Mol Reprod Dev* 2007; 74(9):1149-56.
- Friemel C, Ammerpohl O, Gutwein J, Schmutzler AG, Caliebe A, Kautza M, et al. Array-based DNA methylation profiling in male infertility reveals allele-specific DNA methylation in PIWIL1 and PIWIL2. *Fertil Steril* 2014; 101:1097-1103.
- Gicquel C, Gaston V, Mandelbaum J, Siffroi JP, Flahault A, Le Bouc Y. In vitro fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the KCN10T gene. *Am J Hum Genet* 2003; 72:1338-1341.
- Hackett JA, Sengupta R, Zyllicz JJ, Murakami K, Lee C, Down TA, Surani MA. Germline DNA demethylation dynamics and imprint erasure through 5-hydroxymethylcytosine. *Science* 2013; 339(6118):448-52.
- Halliday J, Oke K, Breheny S, Algar E, Amor DJ. Beckwith-Wiedemann syndrome and IVF: a case-control study. *Am J Hum Genet* 2004; 75:526-528.
- Heyn H, Ferreira HJ, Bassas L, Bonache S, Sayols S, Sandoval J, et al. Epigenetic Disruption of the PIWI Pathway in Human Spermatogenic Disorders. *PLoS One* 2012; 7:e47892.
- Iqbal K, Jin SG, Pfeifer GP, Szabó PE. Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(9):3642-7.
- Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 2010;466(7310):1129-33.
- Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 2011;333:1300-3.
- Jirtle RL. The Agouti mouse: a biosensor for environmental epigenomics studies investigating the developmental origins of health and disease. *Epigenomics*

2014;6(5):447-50.

Kallen B, Finnstrom O, Nygren KG, Olausson PO. In vitro fertilization (IVF) in Sweden: risk for congenital malformations after different IVF methods. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005; 73:162–169.

Kallen B, Finnstrom O, Lindam A, Nilsson E, Nygren KG, Otterblad PO. Congenital malformations in infants born after in vitro fertilization in Sweden. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2010; 88:137–143.

Kaminsky ZA, Tang T, Wang SC, Ptak C, Oh GH, Wong AH, et al. DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins. *Nat Genet* 2009; 41(2):240-5.

Kerjean A, Dupont JM, Vasseur C, Le Tessier D, Cuisset L, Paldi A, et al. Establishment of the paternal methylation imprint of the human H19 and MEST/PEG1 genes during spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 2000; 9(14):2183-7.

Kobayashi H, Sato A, Otsu E, Hiura H, Tomatsu C, Utsunomiya T, et al. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Hum Mol Genet* 2007; 16(21):2542-51.

Kobayashi H, Hiura H, John RM, Sato A, Otsu E, Kobayashi N, et al. DNA methylation errors at imprinted loci after assisted conception originate in the parental sperm. *Eur J Hum Genet* 2009; 17(12):1582-91.

Krausz C, Sandoval J, Sayols S, Chianese C, Giachini C, Heyn H, Esteller M. Novel Insights into DNA Methylation Features in Spermatozoa: Stability and Peculiarities. *PLoS One* 2012; 7:e44479.

Lim AL, Ferguson-Smith AC. Genomic imprinting effects in a compromised in utero environment: implications for a healthy pregnancy. *Semin Cell Dev Biol* 2010; 21(2):201-8.

Lim D, Bowdin SC, Tee L, Kirby GA, Blair E, Fryer A, et al. Clinical and molecular genetic features of Beckwith–Wiedemann syndrome associated with assisted reproductive technologies. *Hum Reprod* 2009; 24:741–747.

Ludwig M, Katalinic A, Gross S, Sutcliffe A, Varon R, Horsthemke B. Increased

prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples. *J Med Genet* 2005;42(4):289-91.

Maher ER, Brueton LA, Bowdin SC, Luharia A, Cooper W, Cole TR, et al. Beckwith–Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART). *J Med Genet* 2003; 40:62–64.

Market-Velker BA, Fernandes AD, Mann MR. Side-by-side comparison of five commercial media systems in a mouse model: suboptimal in vitro culture interferes with imprint maintenance. *Biol Reprod* 2010a; 83(6):938-50.

Market-Velker BA, Zhang L, Magri LS, Bonvissuto AC, Mann MR. Dual effects of superovulation: loss of maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner. *Hum Mol Genet* 2010b; 19(1):36-51.

Marques CJ, Carvalho F, Sousa M, Barros A. Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *Lancet* 2004; 363(9422):1700-2.

Marques CJ, Costa P, Vaz B, Carvalho F, Fernandes S, Barros A, et al. Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Mol Hum Reprod* 2008; 14(2):67-74.

Marques CJ, Francisco T, Sousa S, Carvalho F, Barros A, Sousa M. Methylation defects of imprinted genes in human testicular spermatozoa. *Fertil Steril* 2010; 94(2):585-94.

McGraw S, Shojaei Saadi HA, Robert C. Meeting the methodological challenges in molecular mapping of the embryonic epigenome. *Mol Hum Reprod* 2013; 19(12):809-27.

Minor A, Chow V, Ma S. Aberrant DNA methylation at imprinted genes in testicular sperm retrieved from men with obstructive azoospermia and undergoing vasectomy reversal. *Reproduction* 2011; 141(6):749-57.

Nelissen EC, Dumoulin JC, Daunay A, Evers JL, Tost J, van Montfoort AP. Placentas from pregnancies conceived by IVF/ICSI have a reduced DNA methylation level at the H19 and MEST differentially methylated regions.

Hum Reprod 2013; 28(4):1117-26.

Ørstavik KH, Eiklid K, van der Hagen CB, Spetalen S, Kierulf K, Skjeldal O, Buiting K. Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection. *Am J Hum Genet* 2003; 72(1):218-9.

Pacheco SE, Houseman EA, Christensen BC, Marsit CJ, Kelsey KT, Sigman M, Boekelheide K. Integrative DNA methylation and gene expression analyses identify DNA packaging and epigenetic regulatory genes associated with low motility sperm. *PLoS One* 2011; 6:1–10.

Pathak S, Kedia-Mokashi N, Saxena M, D'Souza R, Maitra A, Parte P et al. Effect of tamoxifen treatment on global and insulin-like growth factor 2-H19 locus-specific DNA methylation in rat spermatozoa and its association with embryo loss. *Fertil Steril* 2009; 91(5 Suppl):2253-63.

Pathak S, D'Souza R, Ankolkar M, Gaonkar R, Balasinar NH. Potential role of estrogen in regulation of the insulin-like growth factor2-H19 locus in the rat testis. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 314(1):110-7.

Pembrey M, Saffery R, Bygren LO; Network in Epigenetic Epidemiology. Human transgenerational responses to early-life experience: potential impact on development, health and biomedical research. *J Med Genet* 2014; 51(9):563-72.

Pladevall M. Estudi del patró de metilació del DNA en regions regulades per impressió genètica en espermatozoides d'individus infèrtils: implicacions reproductives. Tesis Doctoral. 2011 Ed Universitat Autònoma de Barcelona.

Poplinski A, Tüttelmann F, Kanber D, Horsthemke B, Gromoll J. Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant methylation of MEST and IGF2/H19 ICR1. *Int J Androl* 2010; 33(4):642-9.

Roadmap Epigenomics Consortium, Kundaje A, Meuleman W, Ernst J, Bilenky M, Yen A, et al. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature* 2015; 518(7539):317-30.

Sato A, Otsu E, Negishi H, Utsunomiya T, Arima T. Aberrant DNA methylation of

imprinted loci in superovulated oocytes. *Hum Reprod* 2007; 22(1):26-35.

Schütte B, Hajj N E I, Kuhtz J, Nanda I, Gromoll J, Hahn T, et al. Broad DNA methylation changes of spermatogenesis, inflammation and immune response-related genes in a subgroup of sperm samples for assisted reproduction. *Andrology* 2013; 1:822-829.

Seisenberger S, Peat JR, Hore TA, Santos F, Dean W, Reik W. Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2013; 368(1609):20110330.

Sutcliffe AG, Peters CJ, Bowdin S, Temple K, Reardon W, Wilson L, et al. Assisted reproductive therapies and imprinting disorders—a preliminary British survey. *Hum Reprod* 2006; 21:1009-1011.

Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 2009; 324(5929):930-5.

Tang WW, Dietmann S, Irie N, Leitch HG, Floros VI, Bradshaw CR, et al. A Unique Gene Regulatory Network Resets the Human Germline Epigenome for Development. *Cell* 2015; 161(6):1453-67.

Urduingui RG, Bayon GF, Dmitrijeva M, Torano EG, Bravo C, Fraga MF, et al. Aberrant DNA methylation patterns of spermatozoa in men with unexplained infertility. *Hum Reprod* 2015; 0:1-15.

van Montfoort AP, Hanssen LL, de Sutter P, Viville S, Geraedts JP, de Boer P. Assisted reproduction treatment and epigenetic inheritance. *Hum Reprod Update* 2012; 18(2):171-97.

Viot G, Epelboin S, Olivennes F. Is there an increased risk of congenital malformations after ART? Results from a prospective French long-term survey of a cohort of 15 162 children. *Hum Reprod* 2010; 25:i54.

Waddington CH. *The Strategy of the Genes*. London, UK: Allen & Unwin; 1957

Waterland RA, Jirtle RL. Transposable elements: targets for early nutritional

effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol* 2003; 23(15):5293-5300.

Whitelaw N, Bhattacharya S, Hoad G, Horgan GW, Hamilton M, Haggarty P. Epigenetic status in the offspring of spontaneous and assisted conception. *Hum Reprod* 2014; 29(7):1452-8.

Wossidlo M, Nakamura T, Lepikhov K, Marques CJ, Zakhartchenko V, Boiani M, et al. 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nat Commun* 2011; 2:241.

Zogel C, Böhringer S, Gross S, Varon R, Buiting K, Horsthemke B. Identification of cis- and trans-acting factors possibly modifying the risk of epimutations on chromosome 15. *Eur J Hum Genet* 2006; 14(6):752-8.

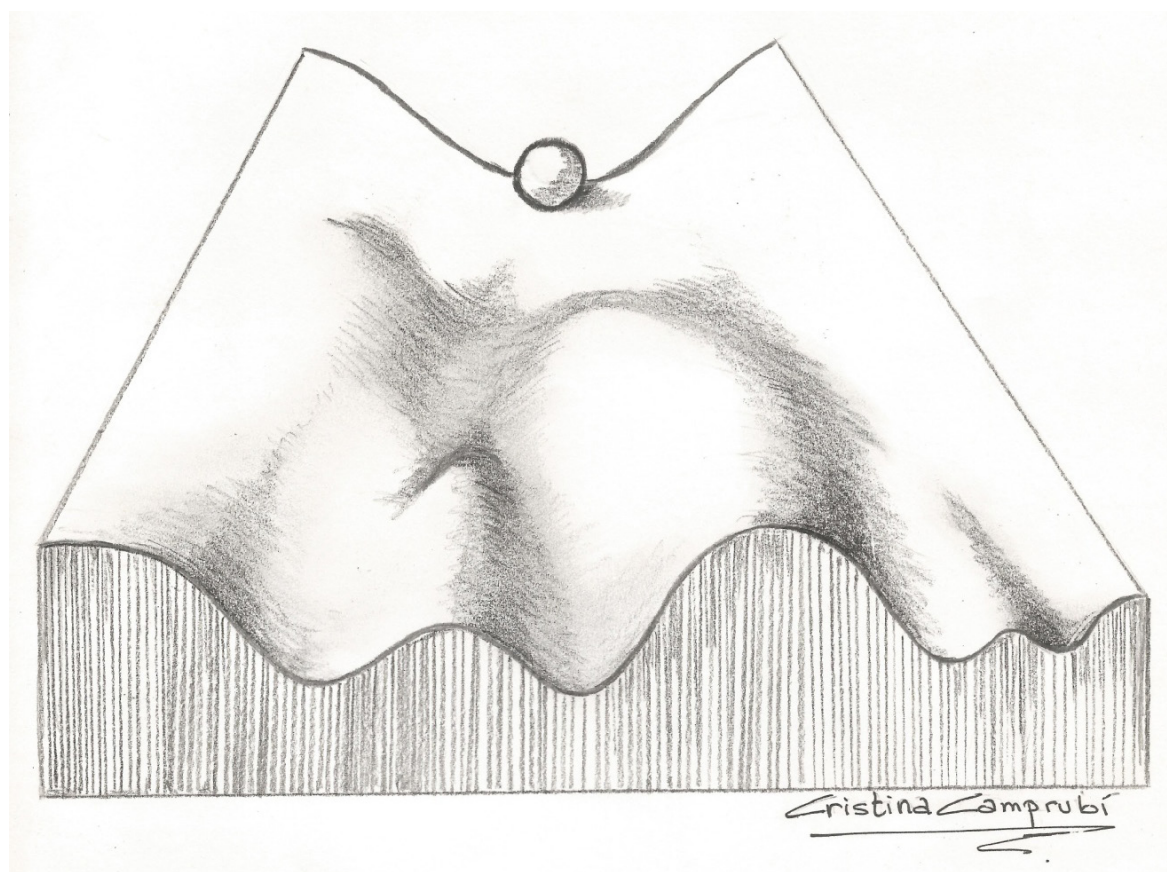
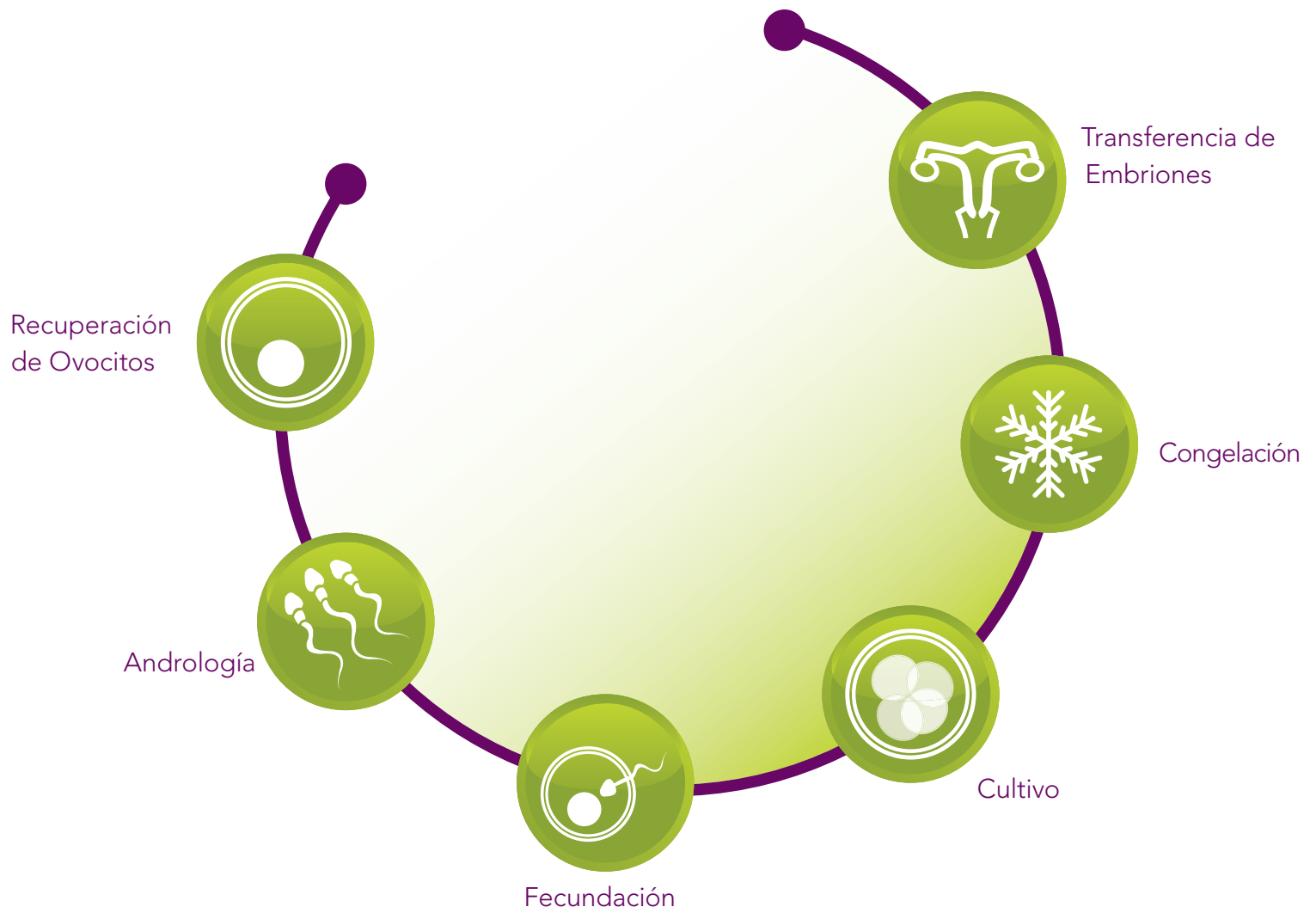


Figura 1. Reproducción a lápiz del paisaje epigenético de Conrad Hal Waddington por Cristina Camprubi.

ORIGIO- Su proveedor de soluciones para FIV



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

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



origio

a CooperSurgical Company

Origio Medicult Espana S.L

C/ Platón 6 • 08021 Barcelona • España

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

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

SCREENING DE ENFERMEDADES RECESIVAS PARA DONANTES Y PACIENTES.

Dr. Ernesto Bosch
 Director Area Medicina Reproductiva. IVI Valencia
Ernesto.Bosch@ivi.es

INTRODUCCIÓN

Cada año muchos padres se ven sorprendidos en el embarazo o en el nacimiento con un hijo afectado por algún tipo de patología, o incluso que esta se desarrolle en los primeros años de vida de forma inesperada. Algunas de estas enfermedades ocurren ocasionalmente y no tienen componente causal conocido, lo que quiere decir que son esporádicas o idiopáticas, mientras que otras se producen porque uno o ambos progenitores son portadores de una alteración genética desconocida para ellos, al tratarse de personas sanas.

IVI, en su voluntad de disminuir riesgos médicos en los embarazos y la descendencia, y haciendo uso de las tecnologías más avanzadas disponibles en la actualidad, decidió poner en práctica un programa de análisis genético con el fin de reducir las probabilidades de que los niños padezcan alteraciones genéticas conocidas. Este estudio se aplica a los donantes de gametos y a los pacientes que recurran al uso de estos gametos, pero también está disponible para aquellas parejas que, usando gametos propios, soliciten que sea testado su ADN, tanto con anterioridad a un tratamiento de reproducción asistida como de un embarazo natural.

Por otra parte, la información que se obtiene del análisis genético también resulta muy beneficiosa para los donantes, dado que –salvo que manifiesten expresamente su negativa a conocer los resultados del test– dispondrán de una información sobre su condición de portadores de mutaciones genéticas que podrán tener en cuenta en el momento en que deseen ser padres, cotejándola con un análisis similar que se pueda realizar su pareja.

EL TEST DE SCREENING DE ENFERMEDADES RECESIVAS

¿En que se basa este test? El test está basado en la capacidad de secuenciar el exoma, parte del ADN que contiene exclusivamente la información genética útil, que va a ser responsable del funcionamiento de células y organismos.

Para su comprensión, primero, deben repasarse unos conceptos básicos de genética, que permitan el entendimiento conceptual del sistema de compatibilidad genética:

¿QUÉ SON LOS GENES Y MUTACIONES?

Cada una de nuestras células contiene información genética o ADN, organizada en estructuras conocidas como cromosomas, que a su vez contienen unidades básicas, los genes. Los genes contienen la información para fabricar proteínas, encargadas de las funciones biológicas.

En humanos la dotación cromosómica normal es de 46 (23 pares), conociéndose uno de estos pares como

el par de cromosomas sexuales, XX en mujeres y XY en varones. Cada individuo hereda una copia para cada cromosoma de cada uno de sus progenitores. Por tanto, se tienen dos copias de cada cromosoma y gen (excepto en los varones, que contienen cromosomas X e Y individuales).

Los cambios en el ADN o mutaciones en los genes dan lugar a alteraciones en proteínas, en las cuales, al alterarse su conformación, se afecta su función, y estos cambios son responsables en último término de múltiples enfermedades genéticas.

ENFERMEDADES MONOGÉNICAS

Se denominan monogénicas aquellas enfermedades causadas por la alteración de un gen en concreto, en contraposición a las causadas por alteraciones y la contribución de varios genes combinado con factores ambientales, denominadas multifactoriales.

Según estimaciones de la OMS, existen unas 7000 enfermedades monogénicas

HECHOS RESPECTO A LAS ENFERMEDADES GENÉTICAS

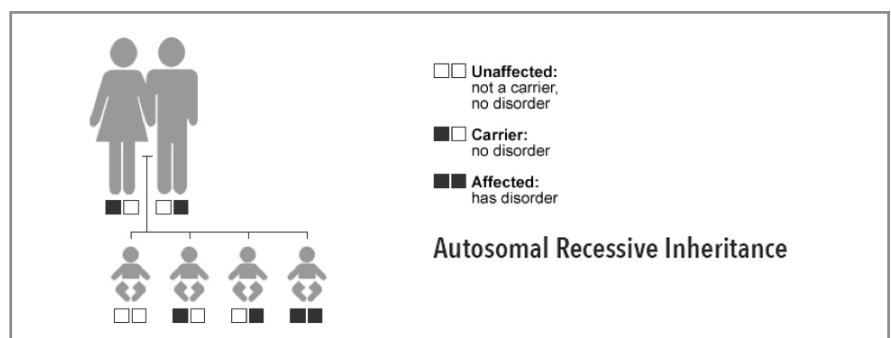


Fig 1. 6000-7000 enfermedades monogénicas descritas, de las que aprox 1140 son recesivas. Incidencia combinada de todas ellas: 1/300 nacimientos aprox. (sobre 0.5-1%). TODOS tenemos alrededor de 6-18 mutaciones recesivas severas que pueden causar una enfermedad genética.

LAS ENFERMEDADES MONOGENICAS DOMINANTES

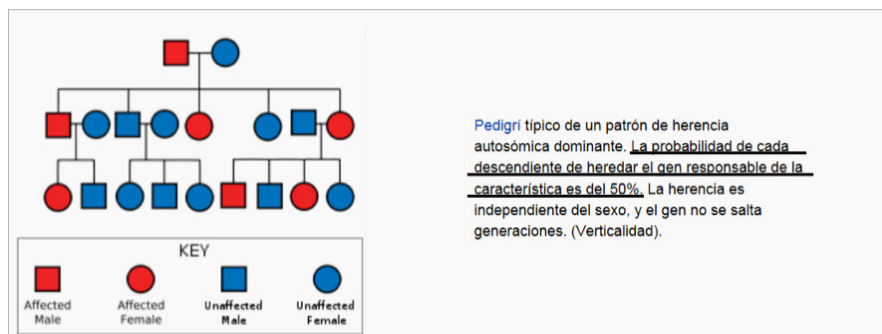


Fig 2. Las mutaciones DOMINANTES pueden pasar desapercibidas en determinados casos Aparición tardía.

Penetrancia o expresividad variable no detectables en la anamnesis.

Mosaicismos germinales: donante sano, con mutación en línea germinal.

distintas. La prevalencia global para éstas es del 1%. Además, en países desarrollados, suponen la causa del 18% de hospitalizaciones pediátricas y un 20% de mortalidad infantil. A pesar de que se las suele denominar "enfermedades raras", por su baja prevalencia individual, en conjunto, son más frecuentes de lo que la población pueda pensar, ya que aproximadamente un 0.5% de nacidos están afectados por alguna de ellas, incrementándose notablemente su relevancia. (Figura 1)

HECHOS RESPECTO A LAS ENFERMEDADES GENÉTICAS

En base a su tipo de herencia y su localización en cromosomas distinguimos:

Las enfermedades autosómicas dominantes, que son aquellas en las que el gen está en un cromosoma no sexual. Además para que se manifieste la enfermedad sólo se necesita que una de las dos copias heredadas por el individuo (la heredada del padre o la heredada de la madre), esté alterada. Ser portador de esta alteración, significa que o bien está enfermo, o muy probablemente se va a desarrollar la enfermedad más adelante. Además, podría transmitirla al 50% de sus descendientes, con el riesgo de que estos también padezcan la enfermedad.

En este caso, generalmente la persona estaría enferma en el momento de aportar los gametos, pero en ciertas situaciones o para ciertas de estas

LAS ENFERMEDADES MONOGENICAS O RECESIVAS

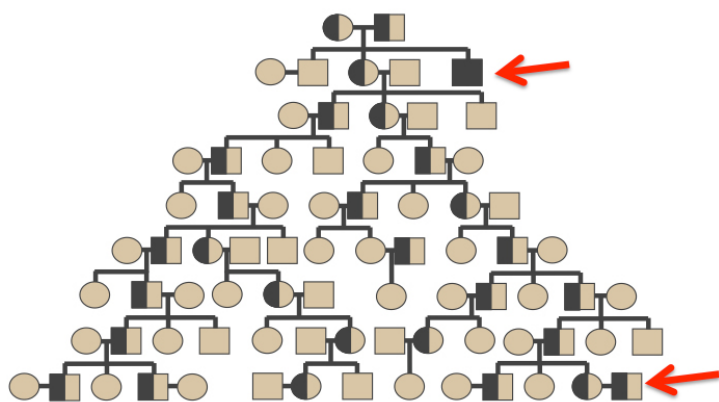


Fig 3. Las MUTACIONES RECESIVAS pueden pasar desapercibidas durante generaciones Los portadores no tienen por qué padecer síntomas ni tener antecedentes familiares. NO DESCARTABLES MEDIANTE LA ANAMNESIS.

Por lo tanto, lo más apropiado para detectar portadores es testarlos.

enfermedades, aparecen de forma tardía en la vida del individuo, o son muy leves y no se ha detectado su manifestación. Incluso mutaciones presentes sólo en las células a partir de las cuales se desarrollarán óvulos y espermatozoides harían que un individuo fuese sano pero pudiese transmitir una alteración dominante, teniendo descendencia afecta. Es el conocido como mosaico o mosaicismo germinal. (Figura 2)

Las enfermedades autosómicas recesivas son aquellas en las que el gen igualmente está en un cromosoma no sexual. Para que se manifieste la enfermedad se necesita que las dos copias heredadas de un mismo gen (la heredada del padre y la heredada de la madre) estén alteradas. Por tanto, ser portador de la alteración en una sola copia no significa estar enfermo, ni que lo vaya a estar en un futuro. Si ambos progenitores son portadores de mutación en un mismo gen el riesgo para la descendencia es del 25%. (Figura 3)

Las enfermedades ligadas al cromosoma X son aquellas en las que el gen está posicionado en dicho cromosoma sexual. Generalmente se comportan de forma recesiva, por tanto las mujeres al tener dos cromosomas X son portadoras y no padecen la enfermedad. En cambio los varones al tener un solo X si manifiestan síntomas de la enfermedad. El riesgo para las descendencia es del 25% (varones que heredan el gen materno alterado). En ocasiones el comportamiento es dominante o pseudo-dominante y las mujeres pueden manifestar síntomas.

A priori, todas las personas somos potencialmente portadores de un número variable de mutaciones genéticas, aunque se trate de una persona sana, por lo que es generalmente desconocido. En la población general, se estima que un individuo sano podría tener un promedio de 5 mutaciones. Dependiendo de su localización y patrón de herencia supondrán estar enfermo o no. No obstante muchas de estas pasan desapercibidas ya que se asocian principalmente a las enfermedades monogénicas recesivas. En este contexto, ser portador de una mutación genética significa que la

persona tiene una alteración en una de las copias de un gen concreto. Cuando ambos miembros de una pareja son portadores de una mutación recesiva en un mismo gen cada uno de ellos puede aportar a los hijos su copia alterada (sucede un 25% de las veces) y en dicho caso tendrían un hijo/a afectado/a.

En el contexto de las enfermedades monogénicas, una prueba genética consiste en el estudio de la secuencia de ADN, es decir el análisis de la información contenida en los genes. Distinguimos dos objetivos principales: (a) prueba diagnóstica, para identificar alteraciones que puedan explicar síntomas clínicos en un enfermo y (b) prueba de cribado, identificar personas portadoras de mutaciones y por consiguiente con alto riesgo de transmitir las a la descendencia y que ésta enferme.

El uso de una prueba genética de cribado tiene como propósito prevenir estas enfermedades; y para ello se hace necesario conocer qué alteraciones presenta cada individuo que aporta sus gametos a la fecundación, con el fin de comparar las mutaciones recesivas de ambos, verificando que no existen entre ellos coincidencias de alteraciones del mismo gen.

Esta clase de pruebas son recomendables tanto para parejas que vayan a usar sus propios gametos (en reproducción natural o por técnicas de reproducción asistida) como a parejas o a mujeres que vayan a recurrir a gametos procedentes de donantes. En todo caso el uso de estas pruebas no garantiza al 100% la ausencia de patología en la descendencia ya que sigue existiendo un riesgo residual mínimo debido a que pueden estar presentes alteraciones que no se detectan con el método empleado, o debido a mutaciones de novo -no presentes en los progenitores y que aparecen de forma ocasional en uno de los gametos o en los estadios tempranos embrionarios-. También pueden existir mutaciones que todavía no se han descrito como patológicas, en ningún caso, pudiendo ser de origen familiar o incluso, individual.

TEST DE COMPATIBILIDAD GENÉTICA (TCG):

La secuenciación es el método más eficaz para "leer" el ADN y caracterizar si existen alteraciones en el mismo. Los avanzados métodos de secuenciación permiten realizar análisis de múltiples genes o mutaciones simultáneamente de forma coste-efectiva y por primera vez es posible establecer programas para detectar un gran número de enfermedades monogénicas.

El objetivo del test de compatibilidad genética o TCG es identificar que mutaciones están presentes en un individuo para disminuir notablemente el riesgo de concepción de hijos afectados. Esto es, con la información obtenida se evita que aparezca la propia enfermedad, bien escogiendo a donantes que no tengan alterados los mismos genes o, en el caso de que se aplique a una pareja con sus propios gametos, ofreciéndoles la posibilidad de conocer esta circunstancia y de valorar previamente con su médico sus opciones reproductivas en base al riesgo genético.

En este sentido, para la realización del test, se llevan a cabo diferentes procedimientos y técnicas

EXTRACCIÓN DEL ADN

La extracción del ADN genómico a partir de sangre periférica se realiza a través de tubos de EDTA, usando el MagNAPure Compact NucleicAcidIsolation kit-largevolume (Roche Diagnostics), y la cantidad y calidad del ADN obtenido en cada muestra se determinó mediante la tecnología espectrofotométrica de Nanodrop1000 spectrophotometer and Qubit® 2.0 Fluorometer (ThermoScientific) siguiendo las instrucciones del protocolo del fabricante.

Diseño del panel génico, secuenciación génica dirigida y análisis de datos

La secuenciación masiva en paralelo se lleva a cabo en la plataforma Hiseq2000. Brevemente, se diseñaron y obtuvieron comercialmente las sondas de las secuencias de enriquecimiento del ADN

usando el sistema NimbleDesignsystem (Roche NimbleGen), donde se incluyen todos los exones codificantes con secuencias intrónicasflanqueantes de 30 pares de bases del set de los genes diana elegidos.

Las dianas incluyen 8871 exones con 1.91 Mp de tamaño, y el 99.9% de cobertura en el diseño de sondas. Las capturas dirigidas de los exones se realizaron de acuerdo a protocolos previamente descritos. Cada muestra de ADN fue indexada durante la preparación de las librerías, y cada 20-25 muestras, secuenciadas en una línea de la plataforma Hiseq2000.

El análisis de los datos de la secuenciación se realizó usando "pipelines" previamente descritas. En breve, las Illuminaanalysispipepline (CASAVA1.8) se utilizaron para comparar las bases. Se utilizaron controles internos para eliminar datos de baja calidad, y separar cada set de datos codificado.

Las lecturas fueron mapeadas utilizando, en comparación con el genoma de referencia hg19, y el Genomeanalysisistool kit (GATK) para detectar variaciones en un nucleótido, inserciones, deleciones, duplicaciones, etc...

INTERPRETACIÓN DE VARIANTES

Se utilizó un criterio modificado de las recomendaciones del American College of Medical Genetists. Aquellas variantes con una frecuencia alélica superior al 5% en la base de datos de polimorfismos (dbSNP), >1% en 1,000 genomas proyecto o >1% en exomas control propios (definidas como variantes comunes), o sin relevancia funcional o reportadas en individuos sanos pero no en enfermos se clasifican como polimorfismos.

Variantes potencialmente funcionales, que cumplen los criterios de tener prevalencia inferior al 5% en dbSNP, >1% en 1,000 genomas proyecto o >1% in exomas control propios (definidas como variantes raras), o sin relevancia funcional o reportadas en homocigosis en pacientes sanos, en 1,000 genomas

proyecto o >1% in exomas control propios se clasifican como polimorfismos probables.

Variantes raras incluyendo missensevariants, inframecodingindels, con frecuencias alélicas menores que la prevalencia de las condiciones halladas en las poblaciones humanas, no detectadas en pacientes sanos, en 1,000 genomas proyecto o >1% en exomas control propios se clasifican como de significado desconocido o unknownsignificance (VUS).

Variantes raras, con impacto funcional severo, (frameshiftdeletions, nonsenseSNVs and splicesitevariants) con frecuencia alélica menor que la prevalencia de la enfermedad no detectadas en pacientes o en homocigosis fueron clasificadas como probables patogénicas.

Las mutaciones con evidencia demostrada de vínculo con la enfermedad en uno o más pacientes, fueron clasificadas como patogénicas.

Tests moleculares complementarios

Para confirmar su utilidad en cuanto a la traslación del dato genético a la clínica, se diseñó un test genético complementario, para cubrir algunas de las mutaciones más prevalentes no identificadas por secuenciación masiva, incluyendo tests separados para atrofia muscular, alfa talasemia, etc..., incluyendo las enfermedades y mutaciones listadas.

Spinal Muscular Atrophy (SMN1 mutation: exon 7 deletion).

Alpha thalassemia (mutations: --SEA, -3.7,-4.2,--FIL and --THAI).

Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency (CYP21A2 mutations: c.[710T>A;713T>A;719T>A], c.844G>T, c.955C>T, c.1069C>T,c.1360C>T, c.92C>T; c.293-13A/C>G (c.655A/C>G), c.518T>A and c.923dupT).

Fragile X (FMR1 CGG-expansion).

Hemophilia A (F8 intron 1 and 22

inversions).

Para cada uno de ellos se realizó el análisis con una tecnología específica.

• ¿Qué enfermedades detecta?

El Test de Compatibilidad Genética (TCG) detecta, además de las mutaciones asociadas las enfermedades recomendadas por los colegios profesionales de ginecología y genética, un amplio rango de mutaciones que derivan en enfermedades genéticas graves causadas por 549 genes. Este listado está disponible en la Web www.ivi.net.

Limitaciones del Test de Compatibilidad Genética (TCG).

Aunque los beneficios del test TCG son considerables, existen limitaciones que se describen a continuación:

1) El test TCG no incluye todas las enfermedades genéticas existentes ya que para muchas de ellas aún se desconoce la base genética. Además, no contempla enfermedades multifactoriales -incluye enfermedades monogénicas recesivas y ligadas al cromosoma X.

2) El test TCG no incluye todas las enfermedades monogénicas para las que ya existe conocimiento de su base genética.

3) El test TCG analiza, mediante secuenciación masiva, los genes incluidos en base al conocimiento actual en el momento de realizar la prueba, con las siguientes limitaciones:

a. No se detectan el 100% de las mutaciones en dichos genes ya que algunas de ellas pueden estar localizadas fuera de las regiones génicas en estudio.

b. Puede que para alguna de las variantes presentes en alguno de los genes analizados no se disponga de suficiente información clínica que permita clasificarlas en base a su posible patogenicidad -causantes de patología.

c. Los cambios de ADN causados por

grandes reorganizaciones (deleciones y duplicaciones) no se pueden detectar.

4) Un resultado negativo del test TCG no excluye la posibilidad de aparición de una enfermedad genética en la descendencia debido a la posibilidad de aparición de una mutación de novo. Estas mutaciones de novo surgen de forma espontánea cada cierto número de gestaciones (variable en función de los distintos genes, y en cualquier caso con una incidencia baja).

5) Un resultado negativo del test TCG no excluye la posibilidad de la existencia de un mosaicismo (supuesto infrecuente que se da cuando existen diferencias genéticas entre células que deberían ser idénticas).

a. El mosaicismo puede ser germinal, siendo así que la mutación o mutaciones sólo están presentes en los gametos y por tanto no detectables mediante el test TCG, aunque la probabilidad de que esto ocurra es baja.

b. El mosaicismo puede ser somático -en la muestra de sangre- y si ocurre en bajo porcentaje podría impedir su detección mediante el test TCG. Este mosaicismo somático no excluye que la mutación o mutaciones estén presentes en los gametos y por consiguiente con riesgo de tener descendencia afectada (en cualquier caso esta posibilidad ocurre con una incidencia muy baja).

Desde el punto de vista reproductivo, desconocemos si para estos genes analizados, existe ligado un mejor o peor pronóstico reproductivo. Parece razonable pensar que determinadas variantes de ADN presentes en un mismo gen o un grupo de genes vinculados a una misma función biológica y compartidos por ambos miembros de las parejas podrían cursar con infertilidad, por ejemplo, con la consecución de abortos repetidos, o fallos de implantación; estos casos en los que a priori una información genética concreta fuese motivo de infertilidad no ha sido demostrado, y por tanto, ha podido pasar desapercibida su importancia clínica.

Esto nos llevaría a suponer que el uso

de estas tecnologías, mejoraría los resultados clínicos, sobre todo en el programa de donación de gametos, donde además de las variantes patológicas claras, las variantes de significado clínico desconocido (VSCD) son también consideradas.

CONCLUSIÓN

En la actualidad ya existen datos clínicos de como el uso de estrategias de cribado de mutaciones mejora la prevención de enfermedades genéticas en poblaciones de alto riesgo, por ejemplo en judíos askenazis, o en población general respecto a enfermedades monogénicas prevalentes como la fibrosis quística.

No obstante esos estudios se han basado en estudios limitados de mutaciones, generalmente gen a gen mediante estrategias de genotipado en contraposición a la estrategia de análisis de múltiples genes a lo largo de toda su secuencia mediante secuenciación tipo NGS. El uso de estas técnicas de NGS para diagnóstico está estableciéndose en la actualidad pero no obstante, dado lo novedoso del tema, no existe todavía información o ésta es muy escasa respecto a su uso como estrategia de cribado ni datos respecto a la frecuencia real de portadores en cada región, ni del impacto real sobre la prevención de la consecución de niños afectados, ni siquiera acerca de cómo

la implementación de estas técnicas puede reducir significativamente la obtención de descendientes con este tipo de patologías o mejorar los resultados clínicos.

Es una información fundamental, sobre todo porque se especula la posibilidad de que estas tecnologías se utilicen en un futuro en todas las parejas planeando tener hijos.

SCREENING DE ENFERMEDADES RECESIVAS PARA DONANTES Y PACIENTES: PUNTO DE VISTA DEL JURISTA.

Pedro J. Femenía López
Decano Facultad de Derecho, UA, Alicante
Femenia@ua.es

1.- El screening de enfermedades en donantes y embriones como acto médico.

Tradicionalmente la gestación se ha concebido como un proceso normal con un resultado óptimo en la mayoría de los casos, en el que la actividad médica se ha limitado a garantizar la salud de la madre y del feto y a procurar el nacimiento de éste en condiciones óptimas. La aparición y desarrollo de las técnicas de reproducción asistida ha propiciado que, desde la segunda mitad del siglo XX, se haya enfatizado el indudable valor de los cuidados de la gestación desde su inicio para la salud de la madre y del feto, reconociendo la necesidad de un «control» de la gestación, establecido mediante protocolos sanitarios oficializados por las autoridades sanitarias competentes y dependientes no sólo de factores patológicos sino también, en muchos casos, de factores socioeconómicos, éticos e incluso religiosos[1].

Aparece así el denominado «consejo genético», que engloba el asesoramiento

médico previo a la concepción sobre los riesgos genéticos y reproductivos de una pareja. Cuando la gestación se va a realizar por medio de técnicas de reproducción asistida, dicho «consejo genético» puede englobar la aplicación de técnicas en donantes y embriones (screening) que permitan prever o confirmar la existencia o predisposición a determinadas enfermedades de los donantes o bien la existencia de una anomalía cromosómica, morfológica o genética en el embrión, realizando además un asesoramiento técnico o especializado que facilite a los consultantes la toma de una decisión final.

De acuerdo con lo declarado por el Comité de Expertos en problemas legales del Consejo de Europa, la expresión «acto médico» comprendería «todo tipo de tratamiento, intervención o examen con fines diagnósticos, profilácticos, terapéuticos o de rehabilitación llevados a cabo por un médico o bajo su responsabilidad»[2].

Como expone De Las Heras García[3] bajo la expresión acto o actividad médica cabe englobar tanto el diagnóstico/pronóstico[4] como el tratamiento que a la luz del primero, y conforme a la lex artis, resulte procedente, aunque se pueda llegar a verificar una división ideal de ambas fases que, como pauta general, habrán de venir acompañadas del consentimiento o conformidad por parte del paciente.

Desde este punto de vista, no cabe duda que las técnicas de screening genético suponen un «acto médico» ya que su finalidad puede ser de diagnóstico o predicción de enfermedades genéticas en donantes o embriones.

Las técnicas de diagnóstico son las que se realizan sobre individuos sintomáticos para diagnosticar o descartar una enfermedad genética. Deben considerarse parte integrante de los servicios sanitarios, no siendo, en principio, distintas de otras pruebas diagnósticas, y debiendo acomodarse por ello a criterios de validez analítica, validez clínica y utilidad clínica[5].

Las técnicas predictivas son las que se realizan en individuos asintomáticos con alto riesgo de desarrollar una enfermedad genética de comienzo tardío. Sirven para identificar tanto a sujetos portadores de una mutación responsable de una enfermedad estrictamente hereditaria o monogénica (Test Presintomático) como para detectar una predisposición genética o susceptibilidad a padecer una enfermedad adquirida (Test de Predisposición o Susceptibilidad)[6].

2.- SCREENING DE ENFERMEDADES GENÉTICAS EN DONANTES.

2.1. DELIMITACIÓN.

El screening de enfermedades genéticas en donantes viene enmarcado dentro del proceso de selección y evaluación de los donantes de células reproductoras en procesos de técnicas de reproducción asistida, derivado de la necesidad reconocida por todas las sociedades científicas relacionadas con la donación de gametos, de realizar una historia clínica al donante que recoja sus antecedentes personales y familiares[7].

La donación de gametos está regulada en España por la Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre Técnicas de Reproducción Asistida[8] (LTRA), desarrollada por el RD 412/1996, de 1 de marzo, por el que se establecen los Protocolos obligatorios de Estudio de los Donantes y Usuarios relacionados con las Técnicas de Reproducción humana asistida y se regula la creación y organización del Registro nacional de Donantes de Gametos y Preembriones con fines

de Reproducción Humana[9] y por el Real Decreto-ley 9/2014, de 4 de julio, 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[10].

En referencia al screening de donantes, el art. 5.6 LTRA establece la obligación del centro médico de cumplir las exigencias de un protocolo obligatorio de estudio de los donantes que incluirá sus características fenotípicas y psicológicas, así como las condiciones clínicas y determinaciones analíticas necesarias para demostrar, según el estado de los conocimientos de la ciencia y de la técnica existentes en el momento de su realización, que los donantes no padecen enfermedades genéticas, hereditarias o infecciosas transmisibles a la descendencia. Estas mismas condiciones serán aplicables a las muestras de donantes procedentes de otros países; en este caso, los responsables del centro remitidor correspondiente deberán acreditar el cumplimiento de todas aquellas condiciones y pruebas cuya determinación no se pueda practicar en las muestras enviadas a su recepción. En todo caso, los centros autorizados podrán rechazar la donación cuando las condiciones psicofísicas del donante no sean las adecuadas.

Como acto médico, el screening genético de donantes viene delimitado, además por las siguientes obligaciones:

La obligación de informar: Antes de la formalización, los donantes habrán de ser informados de los fines y consecuencias del acto[11].

La obligación de recabar el consentimiento informado: La información y el consentimiento deberán efectuarse en formatos adecuados, siguiendo las reglas marcadas por el principio del diseño para todos, de manera que resulten accesibles y comprensibles a las personas con discapacidad[12].

La obligación de garantizar el anonimato de la identidad de los donantes: La donación será anónima y deberá garantizarse la confidencialidad de los datos de identidad de los donantes por los bancos de gametos, así como, en su caso, por los registros de donantes y de actividad de los centros que se constituyan[13].

2.2 La obligación de realizar los estudios y protocolos reglamentariamente establecidos para el screening de donantes.

El establecimiento de protocolos obligatorios de estudio de los donantes y usuarios es necesario al objeto de lograr una uniformidad en los criterios básicos y mínimos a los que deben someterse dichos sujetos para permitir un control sanitario de los mismos y garantizar el nivel de calidad exigible, descartando en la medida de lo posible la aparición de malformaciones y enfermedades congénitas de carácter hereditario a la descendencia.

Por otro lado, debe garantizarse que

[1] Del campo casanelles, m. (2009), p.3.

[2] Vid., de las heras garcía, m.a. (2005), p. 461, recogiendo además una síntesis de las definiciones de este concepto aportadas por la doctrina.

[3] De las heras garcía, m.a. (2005), p. 477.

[4] El autor (op. cit., p. 466) entiende el «pronóstico» como un acto distinto del diagnóstico, aunque en estrecha relación con él, acerca de la terminación probable de una enfermedad con relación a un concreto individuo, de lo que se desprende que supone una evaluación ulterior al diagnóstico, previa al tratamiento en caso de ser éste preciso, que no se suele diferenciar a menudo por estimarlo incluido en el primero.

Compartiendo plenamente este concepto añadiríamos nosotros que también supone «pronóstico» el cálculo hipotético de probabilidades de padecer una determinada enfermedad o anomalía, cálculo basado en la información suministrada por el paciente al médico y no en técnicas de diagnóstico realizadas por éste. Desde este punto de vista el pronóstico sería previo al diagnóstico y al tratamiento.

el tratamiento médico que se aplica es el más idóneo de acuerdo con las condiciones clínicas y fisiológicas que provocan la esterilidad, por lo que los centros y servicios autorizados para aplicar las técnicas de reproducción asistida vendrán obligados a realizar los análisis y estudios oportunos que permitan identificar las causas de la misma y recomendar el tratamiento más eficiente en cada caso, entre los regulados en nuestra legislación.

El art. 5.6 LTRA establece, como hemos dicho, la obligación de establecer dichos protocolos. Además, según establece el art. 18.4 LTRHA los equipos biomédicos deben realizar a los donantes y a las receptoras cuantos estudios se establezcan reglamentariamente, y deberán cumplimentar los protocolos de información sobre las condiciones de los donantes o la actividad de los centros de reproducción asistida que se establezcan, siendo responsables, según el art. 18.2 LTRHA si, por omitir los estudios establecidos, se lesionan los intereses de donantes o usuarios,

o se transmiten a los descendientes enfermedades congénitas o hereditarias, evitables con aquéllos.

A tal fin, y bajo la vigencia de la LTRA/1988, se dictó el RD 412/1996, de 1 de marzo, por el que se establecen los Protocolos obligatorios de Estudio de los Donantes y Usuarios relacionados con las Técnicas de Reproducción humana asistida y se regula la creación y organización del Registro nacional de Donantes de Gametos y Preembriones con fines de Reproducción Humana[14].

En base a esta norma deben distinguirse los estudios y protocolos realizados a donantes y aquellos que se realizan sobre los usuarios de las técnicas.

En cuanto a los donantes, el art. 3 del RD establece, de forma genérica, la obligación de que sean sometidos a un reconocimiento médico, que se reflejará en una historia clínica, con inclusión de antecedentes personales y familiares, así como un examen físico que, como mínimo, deberá contener: los datos del

protocolo de donantes establecido en el anexo[15].

Por su parte, el art. 4 añade que a lo anterior deberá añadirse los estudios que se determinen por la Comunidad Autónoma respectiva, estableciendo también un contenido mínimo para dichos estudios[16].

Posteriormente, y en desarrollo de la Ley 14/2006 sobre Técnicas de Reproducción asistida, se publicó el Real Decreto 1301/2006, de 10 de noviembre[17], por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para 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. Por medio de este Real Decreto se transponían a nuestro ordenamiento jurídico la Directiva 2004/23/CE[18] y la Directiva 2006/17/CE[19].

[5] Ayuso, c; lorda, i; trujillo, m.j. (2009), pp. 90-91.

[6] Ayuso, c; lorda, i; trujillo, m.j. (2009), p. 91.

[7] Pedrinaci, s; claveró, a; martínez, m; ortiz de galisteo, j.r; gonzález, c; sánchez, s; acal, j.a; fontes, j. (2007), p. 13.

[8] Boe de 27 de mayo de 2006.

[9] Boe de 23 de marzo de 1996. norma dictada en desarrollo de la ley 35/88 sobre técnicas de reproducción humana asistida pero que permanece vigente.

[10] Boe de 5 de julio de 2014.

[11] Art. 5.4 LTRA

[12] Art. 5.4 LTRA, redactado por el apartado uno del artículo 8 de la Ley 26/2011, de 1 de agosto, de adaptación normativa a la Convención Internacional sobre los Derechos de las Personas con Discapacidad («B.O.E.» 2 agosto). Vigencia: 3 agosto 2011.

[13] Art. 5.5 LTRA.

[14] BOE de 23 de marzo de 1996.

[15] Datos personales; datos físicos (talla y peso); color de piel; color de ojos; color y textura del pelo; grupo sanguíneo; raza; historia médica personal (enfermedades; exposición a sustancias químicas especialmente mutágenas o teratógenas; exposición a radiaciones; historia psiquiátrica; prescripción/consumo de drogas, alcohol; historia reproductiva; número de donaciones anteriores; historia ocupacional); historia familiar; protocolo de seminograma y protocolo de estudio de ovocitos.

[16] Grupo sanguíneo; factor Rh; VDRL o prueba similar para detectar la sífilis; screening de hepatitis; test de detección de marcadores de VIH; estudio clínico para la detección de fases clínicas infectivas de toxoplasmosis, rubéola, herpes virus y citomegalovirus; y estudio clínico para la detección de neisseria gonorrhoeae y chlamydia trachomatis.

[17] BOE de 11 de noviembre.

[18] DIRECTIVA 2004/23/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 31 de marzo de 2004 relativa al establecimiento de normas de calidad y de seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos (Diario Oficial de la Unión Europea de 7 de abril de 2004).

[19] DIRECTIVA 2006/17/CE DE LA COMISIÓN de 8 de febrero de 2006 por la que se aplica la Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a determinados requisitos técnicos para la donación, la obtención y la evaluación de células y tejidos humanos (Diario Oficial de la Unión Europea de 9 de febrero de 2006).

En dicho Real Decreto se establecía el protocolo para selección y evaluación de los donantes de células reproductoras. No obstante, contra el mismo se entabló un recurso contencioso-administrativo por parte de una compañía mercantil, recurso que fue estimado por la STS (Sala 3ª) de 30 de mayo de 2014, por la que se declaró nulo el Real Decreto 1301/2006, de 10 de noviembre por insuficiencia de rango.

Esta circunstancia ha conllevado la publicación del Real Decreto-ley 9/2014, de 4 de julio, 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[20], que, solventando el problema de rango legal, reproduce los criterios normativos del Real Decreto de 2006.

Así, en su Anexo IV, el Real Decreto-ley de 2014 establece los criterios de evaluación clínica o de laboratorio para la selección y evaluación de donantes de gametos en base a que la donación se realice entre miembros de una pareja o la donación se realice fuera de la pareja.

En el caso de donaciones realizadas entre miembros de una pareja, únicamente se establece la obligación de cumplir una serie de criterios de evaluación clínica o de laboratorio cuando las células reproductoras vayan a ser almacenadas o procesadas[21].

En tales casos, se realizarán al donante una serie de tests serológicos para evaluar el riesgo de posibles infecciones transmisibles. En concreto, el apartado 2 del Anexo IV establece que se realizarán los siguientes tests

serológicos para evaluar el riesgo de contaminación cruzada: HIV 1 y 2; Hepatitis B; Hepatitis C, programándose un sistema de almacenamiento aislado cuando los resultados de los tests sean positivos o no estén disponibles, o cuando se sabe que el donante tiene algún factor de riesgo de transmisión de estas infecciones. Además, se realizarán tests de determinación de anticuerpos anti HTLV I y II en donantes que viven o vienen de áreas con una elevada incidencia de enfermedad o cuyas parejas sexuales o progenitores vengan o vivan en áreas de elevada influencia de enfermedad. Por último, pueden requerirse tests adicionales (malaria, toxoplasma, Tripanosoma cruzi, dengue, CMV, VEB, RhD) dependiendo de la existencia de viajes, o exposición a riesgo de contagio, o de las características de las células obtenidas.

El hecho de que los tests sean positivos no impide necesariamente que se puedan utilizar las células obtenidas, o los productos derivados, en casos de donación entre personas de la misma pareja, siempre de acuerdo a la normativa vigente.

Cuando la donación se produce fuera de la pareja la selección de los donantes debe hacerse en base a su historia clínica, incluyendo en la evaluación cualquier factor que pueda resultar relevante en la identificación y selección de aquellas personas cuya donación pueda representar un riesgo para la salud de terceros, como la posibilidad de transmitir una enfermedad; los donantes deben tener marcadores serológicos negativos para HIV 1 y 2, HVC; HVB y sífilis, realizándose test de determinación de anticuerpos anti HTLV I y II en aquellos donantes que viven o provienen de zonas con elevada incidencia de enfermedad o

cuyas parejas sexuales o progenitores viven o provienen de áreas con elevada incidencia de enfermedad[22].

Además, se llevará a cabo una evaluación de la carga genética en relación a la existencia de genes autonómicos recesivos de acuerdo al conocimiento científico y a la prevalencia conocida en la etnia del donante, así como una evaluación del riesgo de transmisión de enfermedades hereditarias conocidas y presentes en la familia[23].

En cuanto a la responsabilidad derivada de estos estudios y protocolos debemos distinguir los siguientes supuestos:

a) En primer lugar, la responsabilidad derivada de la omisión directa de los estudios y protocolos que deben realizarse tanto a los donantes de gametos, es decir la responsabilidad derivada de la no realización de dichos estudios y protocolos.

Así se establece en el Real Decreto-ley de 2014 (Anexo IV) cuando se dice que «el facultativo responsable del proceso de donación de gametos debe determinar y documentar, sobre la base de la historia clínica y la indicación terapéutica, la justificación para la obtención y los criterios de seguridad para la madre y los hijos que pudieran resultar del proceso».

En tal caso, los equipos médicos y la dirección del centro o servicio en el que desarrollan sus funciones responderían, de forma objetiva[24], por los daños tanto físicos como morales que pudieran derivarse de la vulneración de este imperativo legal. Así ocurriría, por ejemplo con el nacimiento de un hijo con malformaciones genéticas o hereditarias detectables con dichos estudios o protocolos; el nacimiento de un niño de donante que ya hubiera

[20] BOE de 5 de julio de 2014.

[21] El apartado 1 del Anexo IV establece literalmente que «los criterios de evaluación clínica o de laboratorio no se aplicarán a los casos de donación de células reproductoras entre miembros de una pareja para su uso directo».

[22] Cfr. Anexo IV, apartado 3, letras a), b), c) y d).

[23] Cfr. Anexo IV, apartado 3, letras f) y g).

[24] También, GONZÁLEZ MORÁN, L. (1990), p. 247; CARCABA FERNÁNDEZ, M. (1995), p. 176.

generado más de seis descendientes por reproducción asistida; el nacimiento de un niño procedente de donante con unas características fenotípicas completamente opuestas a la de la usuaria; el nacimiento de un niño portador del virus VIH, etc.

b) En segundo lugar, podría plantearse la responsabilidad derivada del deber de información ligado a la realización de estos estudios y protocolos.

En este sentido, el propio RD 412/1996 establece para los donantes que el contrato de donación se formalizará «... previa información por protocolo de consentimiento informado de los fines y consecuencias del acto, así como de los procedimientos y estudios a los que será sometido el donante» (art. 2.3), mientras que, para los usuarios se dispone el deber del centro de informarlos suficientemente sobre todos los aspectos derivados de la realización de los estudios previos, y, en concreto, sobre las diversas opciones técnicas de reproducción asistida, posibilidades y servicios a su alcance, beneficios y efectos secundarios, posibles estadísticas disponibles y resultados de investigaciones, así como cualquier otro dato que pueda existir al objeto de tomar una decisión adecuadamente informada y responsable (art. 7.3).

c) Por último, podría plantearse la responsabilidad derivada de la propia realización de estos estudios y protocolos, es decir, aquella que haría responder a los equipos biomédicos y a la dirección de los centros o servicios de reproducción asistida, de los daños derivados de una mala praxis en la realización de aquellas pruebas médicas que integran los estudios obligatorios a donantes y usuarios, responsabilidad que quedaría integrada en el deber general de buena praxis conforme a la *lex artis* que debe presidir la realización de las técnicas a cuyo estudio posterior en este trabajo nos remitimos.

2.3 EL DEBER DE INFORMACIÓN.

A tenor del art. 18.2 LTRHA los equipos

biomédicos y la dirección de los centros o servicios en que trabajan serán responsables «... si, por omitir la información..., se lesionan los intereses de donantes o usuarios o se transmiten a los descendientes enfermedades congénitas o hereditarias evitables con aquella información...».

A su vez, el art. 26.2.b), apartado segundo, considera infracción grave: «la omisión de la información... para evitar lesionar los intereses de donantes o usuarios o la transmisión de enfermedades congénitas o hereditarias».

La «información» a la que se refieren estos preceptos viene contemplada como deber en el art. 3.3 LTRHA a cuyo tenor: «La información y el asesoramiento sobre estas técnicas, que deberá realizarse tanto a quienes deseen recurrir a ellas como a quienes, en su caso, vayan a actuar como donantes, se extenderá a los aspectos biológicos, jurídicos y éticos de aquéllas, y deberá precisar igualmente la información relativa a las condiciones económicas del tratamiento».

En referencia concreta al screening de donantes dispone el Anexo IV del Real Decreto-ley 9/2014, de 4 de julio, que una vez concluidas las pruebas se informará a los implicados de los resultados obtenidos de acuerdo con lo dispuesto en la 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 y la Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida. Esta información deberá ser lo más completa posible en relación a los riesgos asociados y a las medidas adoptadas o que se puedan adoptar y debe ser transmitida y explicada claramente al receptor.

Según se afirma en la doctrina[25], la transmisión de la información en estos casos es extremadamente compleja por su alto componente técnico, por lo que debe ser lo suficientemente clara

y completa como para permitir a los consultantes la toma de la decisión que consideren más adecuada a las circunstancias del caso concreto, no limitándose a los riesgos médicos en sentido estricto.

En cuanto al sujeto obligado a transmitir la información, en un proceso en el que intervienen varios profesionales (médicos, biólogos, patólogos...), cada uno de ellos quedará obligado a transmitir la información en el ámbito de la prestación sanitaria que desempeñe. No obstante, la LTRHA establece en su art. 3.3 in fine que la obligación de proporcionar dicha información en las condiciones adecuadas para facilitar su comprensión incumbe «a los responsables de los equipos médicos que lleven a cabo su aplicación en los centros y servicios autorizados para su práctica». De esta forma, aunque en el proceso intervengan varios profesionales, la Ley convierte en «garante» de la información al responsable del equipo médico, en consonancia con la Ley Básica 41/2002, de 14 de noviembre, reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, que incorpora en este ámbito la figura del denominado «médico responsable» al que tras definir en su artículo 3 como aquél «profesional que tiene a su cargo coordinar la información y la asistencia sanitaria del paciente o usuario, con el carácter de interlocutor principal del mismo en todo lo referente a su atención e información durante el proceso asistencial, sin perjuicio de las obligaciones de otros profesionales que participen en las actuaciones asistenciales», le imputa en el artículo 4.3 la obligación de «garantizar al paciente el cumplimiento de su derecho a la información» haciendo también responsables al resto de profesionales que le atienden durante el proceso asistencial o le apliquen una técnica o procedimiento concreto de dicha obligación de informar.

Así pues, para el responsable del equipo médico la obligación de

[25] PANTALEÓN PRIETO, F. (1988), p. 252;ATAZ LÓPEZ, J. (1985), p. 103.

informar constituye, en todo caso, una «obligación de resultado», con independencia de que el error en la información provenga de su propia actuación o de la de cualquiera de los miembros de su equipo[26]. De esta forma, el perjudicado podrá demandar de forma solidaria al «médico responsable» y a aquél que infringió de forma concreta el deber de informar, o, en caso de que éste último sea desconocido, únicamente al primero.

Además, debe determinarse de forma precisa el destinatario de la información, dada la obligación de confidencialidad y secreto médico establecida, de forma general, en los arts. 10.1 y 10.3 LGS, mantenida en la ulterior Ley Básica 41/2002, de 14 de noviembre, reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, y, de forma específica, por lo que hace referencia a las técnicas de reproducción asistida en los artículos 3.6 y 18.3 LTRHA, que establecen la obligación de recoger en una historia clínica, custodiada con la debida protección y confidencialidad, todos los datos relativos a la utilización de estas técnicas, así como los consentimientos firmados para la realización de la donación o de las técnicas.

En este sentido, el art. 3.2 LTRHA dispone que la información deberá realizarse «... tanto a quienes deseen recurrir a ellas como a quienes, en su caso, vayan a actuar como donantes».

Por tanto, en los casos de donación de gametos, los donantes serán destinatarios de la información que haga referencia a los «fines y consecuencias del acto», como dispone expresamente el art. 5.4 LTRHA y el art. 7.2 del RD 412/1996, de 1 de marzo, por el que se crea y organiza el Registro Nacional de Donantes de Gametos y Preembriones, a cuyo tenor «el centro vendrá obligado a informar suficientemente a las usuarias y usuarios por personal

debidamente capacitado sobre estos aspectos, y, en concreto, deberá proporcionar información completa sobre las diversas opciones técnicas de reproducción asistida, posibilidades y servicios a su alcance, beneficios y efectos secundarios, posibles estadísticas disponibles y resultados de investigaciones, así como cualquier otro dato que pueda existir al objeto de tomar una decisión adecuadamente informada y responsable».

En este sentido, creemos que la referencia a esos «otros datos», deberá comprender los siguientes extremos:

- Carácter gratuito, formal y confidencial de la donación (art. 5.1 LTRHA). Existencia de una compensación económica dirigida únicamente a compensar las molestias físicas, gastos de desplazamiento y laborales derivados de la donación (art. 5.3 LTRHA).

- Irrevocabilidad de la donación, salvo que el donante precise para sí los gametos donados y en la fecha de la revocación aquéllos estén disponibles, reintegrando en tal caso el donante los gastos de todo tipo originados al centro receptor (art. 5.2 LTRHA).

- Protección del anonimato del donante, garantizándose la confidencialidad de los datos relativos a su identidad tanto por los bancos de gametos, como, en su caso, por los registros de donantes y de actividad de los centros que se constituyan (art. 5.5, párrafo 1 LTRHA).

- Derecho de los hijos y de las receptoras de gametos a obtener información general de los donantes que no incluya su identidad, excepto en las circunstancias extraordinarias previstas legalmente (art. 5.5, párrafos 2 y 3 LTRHA).

- Garantía de no utilización de los gametos cuando con ellos se alcance un número máximo de seis nacimientos, siendo responsabilidad de cada centro o servicio que utilice gametos

de donantes comprobar de manera fehaciente su identidad, así como, en su caso, las consecuencias de las donaciones anteriormente realizadas en cuanto a la generación de los hijos nacidos previamente (art. 5.7 LTRHA).

- No determinación de la filiación con el nacido a consecuencia de la donación, en ningún caso, incluidos aquellos en que se haya revelado la identidad del donante (art. 8.3 LTRHA).

En relación a los usuarios de las técnicas como destinatarios de la información, la LTRHA no se encarga de determinarlos de forma expresa. Creemos que, en este sentido, será de aplicación lo dispuesto en el párrafo segundo del art. 18.3 LTRHA según el cual «los datos de las historias clínicas, excepto la identidad de los donantes, deberán ser puestos a disposición de la receptora y de su pareja, o del hijo nacido por estas técnicas o de sus representantes legales cuando llegue a la mayoría de edad, si así lo solicitan». A estos efectos cabe entender como pareja el cónyuge, a menos que esté separado legalmente o de hecho, y el conviviente de hecho cuando hubieran prestado su propio semen para realizar la fecundación in vitro o hubieran consentido la misma con semen de donante, ya que en ambos casos se determinará legalmente su paternidad en caso de nacimiento[27].

La LTRHA se encarga de precisar, además, el contenido de la información proporcionada a la mujer con anterioridad a la firma de su consentimiento para la aplicación de las técnicas, diciendo que, en todo caso, incluirá la relativa a «los posibles riesgos para ella misma durante el tratamiento y el embarazo, y para la descendencia, que se puedan derivar de la maternidad a una edad clínicamente inadecuada» (art. 6.2).

La conducta antijurídica generadora de la responsabilidad médica podrá derivar en estos casos, de la omisión de un dato cierto que afecte a la

[26] Así lo entiende también respecto de la figura del «médico responsable», recogida en la Ley Básica 41/2002, de 14 de noviembre, DE LAS HERAS GARCÍA, M.A. (2005), p. 709

[27] Cfr. arts. 6.3, 7 y 8 LTRHA.

realización adecuada de la técnica, o en la incorrecta valoración del mismo. En la mayor parte de las ocasiones la información transmitida por el médico estará basada, además, en un cálculo de probabilidades o pronóstico, por lo que no podrá exigirse directamente su responsabilidad por un error en el resultado del mismo, sino que únicamente podrá establecerse la responsabilidad médica cuando la equivocación sea inexcusable y revele una conducta culpable[28].

En cuanto al fundamento de la responsabilidad, suscribimos la doctrina[29] partidaria de distinguir dos tipos de información en la actividad médica: a) aquella que tiene o puede tener un significado o incidencia terapéuticos sobre el estado general del paciente, cuya omisión supone una directa infracción de los deberes de la lexartis en cuanto puede conducir al fracaso del diagnóstico o tratamiento; b) aquella otra que permite al paciente emitir un consentimiento adecuado para la intervención sobre su propio cuerpo, cuya vulneración vicia de nulidad el denominado consentimiento informado.

Al primer grupo pertenecería la responsabilidad médica derivada de una ausencia de información o prestación defectuosa de la misma, produciéndose el nacimiento de un niño con enfermedades congénitas o hereditarias, evitables con una información adecuada, supuestos que pueden reconducirse al diagnóstico erróneo en la detección de enfermedades congénitas o hereditarias en los donantes de gametos.

La responsabilidad, es, por tanto, subjetiva o por culpa dado que el reconocimiento del deber de información como integrante de la lexartis y como parámetro que debe cumplir la conducta diligente del profesional sanitario, es una cuestión

que actualmente no plantea dudas ni en la doctrina ni en la jurisprudencia[30].

En cambio, en aquellos supuestos en los que la información incide directamente sobre el consentimiento prestado para someterse a la técnica, la ausencia o prestación defectuosa de dicha información viciará por error el consentimiento prestado y determinará, en su caso, la responsabilidad objetiva del médico por los daños y perjuicios derivados de su incumplimiento.

La información, en estos casos, no constituye un criterio de integración de la lexartis médica ya que no incide directamente sobre el diagnóstico y tratamiento del paciente, sino que constituye un deber legal previo al consentimiento del usuario de la técnica que determinará en un sentido u otro dicho consentimiento.

Así ocurrirá cuando se omitan datos ciertos contenidos sobre los usuarios o sobre los donantes que se contengan en la historia clínica, como consecuencia de lo cual se produzca una lesión en sus intereses, como por ejemplo, cuando no se informe de las características fenotípicas e inmunológicas del donante, produciéndose una notable divergencia con la mujer receptora de la técnica (art. 6.4 LTRHA).

El daño que produce el incumplimiento del deber de informar se concretará según el art. 18.3 LTRHA en la «lesión del interés de los donantes o usuarios» o en la «transmisión a los descendientes de enfermedades congénitas o hereditarias», evitables con aquella información.

La referencia a una posible lesión del «interés de los donantes o usuarios» configura un supuesto de daño indeterminado que habrá que concretar caso por caso, demostrando la relación de causalidad entre la

ausencia o prestación defectuosa de la información, y la lesión de bienes o derechos de la personalidad, o intereses patrimoniales de los donantes o usuarios.

2.4 La obligación de recabar el consentimiento informado.

A tenor del art. 18.3 LTRHA, los equipos médicos tienen obligación de recoger en una historia clínica, custodiada con la debida protección y confidencialidad, todas las referencias sobre los donantes y usuarios, así como los consentimientos firmados para la realización de la donación o de las técnicas.

La historia clínica comprende, de este modo, el conjunto de los documentos relativos a los procesos asistenciales de cada paciente, con la identificación de los médicos y de los demás profesionales que han intervenido en ellos, con objeto de obtener la máxima integración posible de la documentación clínica de cada paciente, al menos en el ámbito de cada centro[31].

En su primera publicación en el BOE de 24 de noviembre de 1988, el artículo 19 de la LTRA/1988 establecía en su apartado octavo que «la no realización de las Historias Clínicas o la omisión de las citadas referencias datos o consentimientos, determinará responsabilidades de los equipos biomédicos y de los Centros o Servicios en los que trabajan».

La desaparición de este precepto en la corrección de errores posterior, así como en el texto de la LTRHA que comentamos no impide, en nuestra opinión, mantener la responsabilidad civil médica derivada de la omisión de los consentimientos que sean necesarios para la aplicación de las mismas, como se desprende, por otro lado, de que se considere infracción grave «la omisión de datos, consentimientos y referencias

[28] SANTOS BRIZ, J. (1995), p. 1385.

[29] LLAMAS POMBO, E. (2005), p. 4.

[30] Así lo pone de manifiesto MACIÁ MORILLO, A. (2005), pp. 252 y ss.

[31] Cfr. art. 14.1 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. Sobre la naturaleza jurídica y caracteres de la historia clínica vid, PÉREZ GÁLVEZ, J.F. (2006), pp. 140 y ss.

exigidas por esta Ley, así como la falta de realización de la historia clínica en cada caso» [art. 26.2.b) 3ª LTRHA].

La exigencia general de consentimiento informado viene establecida en el art. 8 de la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de los derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, a tenor del cual toda actuación en el ámbito de la salud de un paciente necesita el consentimiento libre y voluntario del afectado, una vez que, recibida la información pertinente, haya valorado las opciones propias del caso.

En el ámbito específico de las técnicas de reproducción asistida, el art. 3.4 LTRHA dispone que: «La aceptación de la aplicación de las técnicas de reproducción asistida por cada mujer receptora de ellas quedará reflejada en un formulario de consentimiento informado en el que hará mención expresa de todas las condiciones concretas de cada caso en que se lleve a cabo su aplicación».

No obstante, el posterior desarrollo del articulado pone de manifiesto que son varios los consentimientos necesarios para la realización de las técnicas, siendo necesario un estudio particularizado de los mismos a los efectos de determinar la posible responsabilidad médica:

1) El consentimiento para la donación de gametos o preembriones.

La donación de gametos y preembriones se configura en la LTRHA como un contrato gratuito, formal y confidencial concertado entre el donante y el centro autorizado (art. 5.1).

La forma de dicho contrato debe ser necesariamente escrita y, antes de la formalización, los donantes habrán de ser informados sobre los fines y consecuencias del acto (art. 5.4 LTRHA).

De ello se deduce claramente que el consentimiento que integra la donación de gametos o preembriones es un consentimiento contractual, necesario para que exista el propio contrato de donación.

Dadas las condiciones en las que deben ser donados los gametos o preembriones es muy poco probable pensar en supuestos de donación sin el consentimiento del donante, a no ser aquellas extracciones realizadas en centros sanitarios a pacientes en estado de inconsciencia. Sí es posible, en cambio, pensar en supuestos en los que el consentimiento del donante esté viciado, sobre todo en caso de error sobre los fines y consecuencias del propio acto como consecuencia de una información defectuosa.

En cualquier caso, la ausencia o vicio del consentimiento en la donación de gametos o preembriones no determina la responsabilidad civil del médico sino la nulidad del contrato por ausencia de uno de sus elementos esenciales (art. 1261 CC).

En el supuesto de ausencia del consentimiento, el sujeto o la pareja de la que proceden los gametos o preembriones, o cualquier sujeto con interés en declarar la nulidad del acto, puede interponer la acción de nulidad, sin que dicha acción esté sometida a plazo de prescripción alguno. Por el contrario, en el supuesto de consentimiento viciado, la acción correspondería únicamente al donante, que dispondría de un plazo de caducidad de cuatro años para deshacer los efectos del acto, contados a partir de la cesación del vicio.

En ambos casos, los efectos de la nulidad serán los mismos, concretándose en la revocación de gametos o preembriones. Dicha revocación no se verá por tanto afectada por la circunstancia excepcional del art. 5.2 LTRHA que únicamente la admite cuando el

donante precisase para sí los gametos o preembriones donados, y siempre que en la fecha de revocación aquéllos estén disponibles.

Por último, estimamos que en caso de nulidad contractual no procederá la devolución de los gastos de todo tipo originados al centro receptor de los gametos o preembriones, ya que dicha devolución está contemplada en la Ley únicamente para los casos de revocación unilateral por parte del donante (art. 5.2 LTRHA).

2) El consentimiento para la utilización de gametos o preembriones.

La LTRHA configura el consentimiento para la utilización de gametos o preembriones como un consentimiento distinto de aquél que se requiere para formalizar el contrato de donación.

Así se desprende claramente del art. 11 LTRHA en cuyo apartado 5 se dice que la utilización de los preembriones o, en su caso, del semen, los ovocitos o el tejido ovárico crioconservado, requerirá del consentimiento informado correspondiente debidamente acreditado.

En el supuesto de crioconservación de gametos, el consentimiento necesario para su utilización deberá prestarlo el donante, mientras que para la utilización de preembriones el consentimiento deberá prestarlo la mujer y, en caso de estar casada, su cónyuge (art. 11.5 LTRHA), pudiendo modificarse dicho consentimiento en cualquier momento anterior a su aplicación[32]. En el caso de los preembriones, la LTRHA dispone además un sistema de renovación o modificación del consentimiento firmado que deberá realizarse cada dos años como mínimo, disponiéndose, en este sentido, que si durante dos renovaciones consecutivas fuera imposible obtener de la mujer o de la pareja progenitora la firma

[32] La posibilidad de revocación respecto al consentimiento de la mujer aparece expresamente contemplada en la propia LTRHA. En cuanto al consentimiento del varón, la Ley española, al igual que otras homólogas europeas, guarda silencio sobre este punto. No obstante, en una reciente sentencia de 7 de marzo de 2007, el Tribunal Europeo de Derechos Humanos (TEDH) niega el derecho de una mujer a gestar los embriones concebidos «in vitro» con esperma de su marido y mantenidos en estado de crioconservación, sobre la base de la negativa del mismo a que se produjera dicha transferencia. Sobre esta sentencia vid. <http://www.biotecaweb.com> (noticia publicada el 1 de mayo de 2007).

del consentimiento correspondiente, pudiéndose demostrar de forma fehaciente las actuaciones del centro médico para obtener dicho consentimiento sin obtener la respuesta requerida, los preembriones quedarán a disposición del centro en el que se encuentran criopreservados para destinarlos a cualquiera de los fines admitido.

De esta forma, la ausencia del consentimiento necesario para la utilización de gametos o preembriones, en cualquiera de las situaciones contempladas legalmente, determinará la responsabilidad objetiva del centro en el que se encuentran criopreservados, por los daños patrimoniales y morales que pudieran derivarse de su actuación. El resarcimiento por daños patrimoniales quedará limitado, no obstante, a aquellos supuestos en que la utilización de los gametos o preembriones por parte del centro, sin contar con el consentimiento necesario haya determinado la pérdida de capacidad reproductiva del sujeto, al no poder aportar nuevos gametos o preembriones.

Especialmente significativo es, en este sentido, el supuesto ocurrido en Alemania[33] en el que un sujeto ante la proximidad de una operación por carcinoma en la vesícula que comportaría su esterilidad decidió depositar su esperma en una clínica para asegurarse la posibilidad de tener hijos en el futuro por medio de la inseminación artificial. Dos años después el sujeto -que en este intervalo había contraído matrimonio- se dirige a la clínica con su mujer para iniciar un proceso de inseminación artificial. Sin embargo, dicho proceso no pudo iniciarse porque su esperma había sido

destruido erróneamente por la clínica, sin contar con su consentimiento. El BGH alemán, en sentencia de 9 de noviembre de 1993[34], condenó al hospital a una indemnización de 25.000 marcos por los daños materiales y morales que causó al sujeto la pérdida del esperma, al entender que su destrucción podía considerarse como una lesión personal, ya que en este caso el esperma conservado representaba la única posibilidad de tener hijos.

2.5. La obligación de garantizar el secreto de la identidad de los donantes.

La primera de las conductas que, según el art. 18.2 LTRHA puede determinar la responsabilidad de los equipos biomédicos y la dirección de los centros o servicios en que trabajan es la «violación del secreto de la identidad de los donantes».

El anonimato o secreto de la identidad de los donantes se ha convertido, incluso con anterioridad a la publicación de la LTRA/1988, en uno de los principales objetos de polémica doctrinal en la regulación legal de estas técnicas, pudiendo distinguirse las siguientes orientaciones doctrinales al respecto:

Para un primer grupo de autores, el anonimato del donante quebrantaría normas y principios básicos de carácter constitucional y civil del ordenamiento jurídico español, tales como la dignidad de la persona (art. 10.1 CE), el derecho a no ser discriminado por razón de nacimiento (art. 14 CE) y, fundamentalmente, el derecho a conocer el origen biológico a través de la investigación de la paternidad (art. 39.2 CE). Partiendo de estas premisas comunes, se dividen no obstante a la hora de abogar por una solución legal

entre quienes propugnan directamente la desaparición del anonimato de la regulación de las técnicas[35], quienes defienden, en todo caso, un derecho del hijo a investigar la paternidad con determinación legal de la filiación[36], y quienes sostienen el derecho del hijo a conocer el propio origen biológico, revelándose la identidad del donante, pero sin que ello suponga determinar legalmente la paternidad sobre el nacido como consecuencia de la técnica[37].

En contra, se sitúan aquellos autores para los cuales el anonimato del donante aparece perfectamente justificado sobre la base de que la donación de semen no supone, en ningún caso, un acto de procreación sino simplemente la puesta a disposición de un material biológico con el que los usuarios de la técnica realizarán el correspondiente acto procreador, distinguiéndose a estos efectos entre la filiación por naturaleza y una especie de filiación civil, formal, no biológica o genética, al modo de la filiación adoptiva[38].

Esta segunda línea doctrinal es la adoptada claramente en la legislación española sobre técnicas de reproducción asistida.

Así, la LTRA/1988 precisaba en su art. 5.5 que: «La donación será anónima, custodiándose los datos de identidad del donante en el más estricto secreto y en clave en los Bancos respectivos y en el Registro Nacional de Donantes».

Por su parte, el R.D. 412/1996 de 1 de marzo, por el que se crea y organiza el Registro Nacional de Donantes de Gametos y Preembriones[39] determina en el art. 9 la garantía de secreto al establecer que «La información recogida en la historia clínica de usuarios de las

[33] Relatado por HENRICH. (1994), pp. 731 y ss.

[34] FamRZ, 1994, p. 154.

[35] Así, por ejemplo, VIDAL MARTÍNEZ, J. (1994), pp. 9531 y ss.;

[36] Por ejemplo, DELGADO ECHEVERRÍA, J. (1988), p. 216.

[37] En este sentido, ROCA TRÍAS, E. (1988), pp. 41-42; PANTALEÓN PRIETO, F. (1989), pp. 662 y ss.; BLASCO GASCÓ, F. (1991), pp. 702-703; QUESADA GONZÁLEZ, M.C. (1994), pp. 284 y ss.

[38] Así, MONTÉS PENADÉS, V.L. (1988), pp. 190 y 194; ID. (1994), pp. 972-973; RIVERO HERNÁNDEZ, F. (1988), pp. 166-167; HERNÁNDEZ IBÁÑEZ, C. (1986), pp. 495 y ss.; LLEDÓ YAGÜE, F. (1985), p. 1013.

[39] BOE nº 72 de 23 de marzo.

técnicas de reproducción asistida, la correspondiente al proceso de selección de donantes, así como toda aquella información individualizada contenida en el Registro Nacional de Donantes de Gametos y Preembriones tanto en la Base Central como en los centros y servicios autorizados, serán recogidos, tratados y custodiados en la más estricta confidencialidad, debiendo producirse esta custodia conforme a lo dispuesto por la Ley General de Sanidad, en los artículos 2, 5, 7, 19, 20 y disposición final tercera de la Ley sobre Técnicas de Reproducción Asistida, y artículos 7 y 8 de la Ley Orgánica de Regulación del Tratamiento Automatizado de Datos Personales [...]».

Por último, en la LTRHA el anonimato del donante se convierte en piedra angular del contrato de donación de gametos, siendo caracterizado por las siguientes notas (art. 5.5):

1) Garantía de anonimato y confidencialidad de los datos de identidad de los donantes por los bancos de gametos, así como, en su caso, por los registros de donantes y de actividad de los centros que se constituyan. En este sentido, establece el artículo 18.3 LTRHA la obligación que corresponde a los equipos médicos de recoger en una historia clínica, custodiada con la debida protección y confidencialidad, todas las referencias sobre los donantes y usuarios, así como los consentimientos firmados para la realización de la donación o de las técnicas, datos que, a excepción de la identidad de los donantes, deberán ser puestos a disposición de la receptora, su pareja y el hijo nacido por estas técnicas cuando llegue a la mayoría de edad, si así lo solicitan.

2) Derecho de las receptoras de gametos y preembriones, y de los hijos nacidos a consecuencia de una técnica con intervención de donante, a obtener información general de los donantes que no incluya su identidad.

3) Excepcionalidad en la revelación de la identidad del donante, que sólo podrá producirse en circunstancias

extraordinarias que comporten un peligro cierto para la vida o la salud del hijo o cuando proceda con arreglo a las Leyes procesales penales, siempre que dicha revelación sea indispensable para evitar el peligro o para conseguir el fin legal propuesto, teniendo carácter restringido y no implicando, en ningún caso, publicidad de la identidad de los donantes.

4) No determinación legal de la filiación, en ningún caso, ni siquiera cuando tenga que relevarse la identidad del donante (art. 8.3 LTRHA).

El anonimato del donante aparece configurado, por tanto, como una obligación legal, amparada por el secreto profesional, que no debe ser violado salvo en los supuestos expresamente admitidos legalmente.

La violación de dicho secreto acarreará, por tanto, responsabilidad tanto en el orden disciplinario que la propia ley establece como en el ámbito civil.

En relación con el primero, el art. 26 LTRHA considera como infracción grave, tanto la vulneración por los equipos de trabajo de sus obligaciones legales (entre las que se encuentra la de garantizar el anonimato de los donantes) en el tratamiento a los usuarios de estas técnicas, como la ruptura de las condiciones de confidencialidad de los datos de los donantes establecidas en la Ley, imponiendo la sanción correspondiente (multa comprendida entre 1.001 y 10.000 euros).

En el ámbito civil, la violación del anonimato constituirá un supuesto de responsabilidad objetiva [40], ya que no se vulnera un deber integrado en la *lex artis* médica, sino directamente impuesto por la norma.

BIBLIOGRAFÍA

Ataz López, J.: *Los médicos y la responsabilidad civil*, Madrid, 1985.

Ayuso, C; Lorda, I; Trujillo, M.J.: "Detección y estudio de anomalías genéticas en adultos", en Sánchez-Caro, J. y Abellán, F.

(Coords.): *Medicina Genética Clínica del Siglo XXI. Consideraciones Científicas, Éticas y Legales*, Madrid-Granada, 2009.

Blasco Gascó, F.: «La Ley sobre técnicas de reproducción asistida: constitucionalidad y aplicación», ADC, 1991.

Carcaba Fernández, M.: *Problemas jurídicos planteados por las nuevas técnicas de procreación humana*, Barcelona, 1995.

De Las Heras García, M.A.: *Estatuto ético-jurídico de la profesión médica*, t. II, Madrid, 2005.

Del Campo Casanelles, M.: "Medicina genética preconceptiva y consejo genético", en Sánchez-Caro, J. y Abellán, F. (Coords.): *Medicina Genética Clínica del Siglo XXI. Consideraciones Científicas, Éticas y Legales*, Madrid-Granada, 2009.

Delgado Echeverría, J.: «Los consentimientos relevantes en la fecundación asistida. En especial, el determinante de la asunción de una paternidad que biológicamente no corresponde», en AA VV.: *La filiación a finales del s. XX. Problemática planteada por los avances científicos en materia de reproducción humana*, Madrid, 1988.

González Morán, L.: *La responsabilidad civil del médico*, Barcelona, 1990.

Henrich: «Risarcimento dei dan moralini nel caso di colposadistruzione dello sperma conservato», Riv. Dir. Civ., 1994.

Hernández Ibáñez, C.: «Nuevas técnicas de procreación artificial: consecuencias jurídicas», RGLJ, 1986.

Llamas Pombo, E.: «Un buen ejemplo de responsabilidad por wrongful birth. Comentario a la Sentencia de la Audiencia Provincial de Las Palmas (Sección 5ª) de 25 de enero de 2005», Práctica. Derecho de Daños, nº 32, noviembre 2005.

Lledó Yagüe, F.: «Reflexión jurídica sobre las nuevas formas de concepción humana», La Ley, 1985, nº 2.

Maciá Morillo, A.: *La responsabilidad médica por los diagnósticos preconceptivos*

[40] Así opina también CARCABA FERNÁNDEZ, M. (1995), p. 177.

y prenatales (Las llamadas acciones de wrongfulbirthy wrongfullife), Valencia, 2005.

Montés Penadés, V.L.: «El consentimiento en las nuevas técnicas de reproducción humana», en AA VV.: La filiación a finales del s. XX. Problemática planteada por los avances científicos en materia de reproducción humana, Madrid, 1988.

- «Las categorías negociales en las técnicas de reproducción asistida», AC, 1994.

Pantaleón Prieto, F.: «Procreación artificial y responsabilidad civil», en La filiación a finales del siglo XX. Problemática planteada por los avances científicos en materia de reproducción humana, Madrid, 1988.

- «Contra la Ley sobre técnicas de reproducción asistida», en AA VV: Homenaje al Profesor Juan Roca Juan, Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Murcia, 1989, pgs. 662 y ss.; Id: «Técnicas de reproducción asistida y Constitución», RCEC, 1993.

Pedrinaci, S; Clavero, A; Martínez, M; Ortiz de Galisteo, J.R; González, C; Sánchez, S; Acal, J.A; Fontes, J: "Reflexiones sobre el screening genético a donantes de gametos", en Clavero, A; Gonzalvo, M.C; Castilla, J.A. (Eds.) Reflexiones sobre la Evaluación de donantes de gametos y embriones, Granada, 2007.

Pérez Gálvez, J.F.: «Los Centros y Servicios Sanitarios en la Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre Técnicas de Reproducción Humana Asistida», RVAP, nº 75, 2006.

Quesada González, M.C.: «El derecho (¿constitucional?) a conocer el propio origen biológico», ADC, 1994.

Rivero Hernández, F.: «La investigación de la mera relación biológica en la filiación derivada de fecundación artificial», en AA VV.: La filiación a finales del s. XX. Problemática planteada por los avances científicos en materia de reproducción humana, Madrid, 1988.

Roca Trías, E.: «La incidencia de la inseminación-fecundación artificial en los derechos fundamentales y su protección jurisdiccional», en AA VV.: La filiación a finales del s. XX. Problemática planteada

por los avances científicos en materia de reproducción humana, Madrid, 1988.

Santos Briz, J., en Código Civil. Doctrina y Jurisprudencia, t. VI, vol. 2º, Madrid, 1995.

Vidal Martínez, J.: «La figura legal del anonimato del donante en la regulación de las técnicas de reproducción asistida», RGD, 1994.

[1]Del Campo Casanelles, M. (2009), p.3.

[2]Vid., De Las Heras García, M.A. (2005), p. 461, recogiendo además una síntesis de las definiciones de este concepto aportadas por la doctrina.

[3]De Las Heras García, M.A. (2005), p. 477.

[4]El autor (op. cit., p. 466) entiende el «pronóstico» como un acto distinto del diagnóstico, aunque en estrecha relación con él, acerca de la terminación probable de una enfermedad con relación a un concreto individuo, de lo que se desprende que supone una evaluación ulterior al diagnóstico, previa al tratamiento en caso de ser éste preciso, que no se suele diferenciar a menudo por estimarlo incluido en el primero.

Compartiendo plenamente este concepto añadiríamos nosotros que también supone «pronóstico» el cálculo hipotético de probabilidades de padecer una determinada enfermedad o anomalía, cálculo basado en la información suministrada por el paciente al médico y no en técnicas de diagnóstico realizadas por éste. Desde este punto de vista el pronóstico sería previo al diagnóstico y al tratamiento.

[5]Ayuso, C; Lorda, I; Trujillo, M.J. (2009), pp. 90-91.

[6]Ayuso, C; Lorda, I; Trujillo, M.J. (2009), p. 91.

[7]Pedrinaci, S; Clavero, A; Martínez, M; Ortiz de Galisteo, J.R; González, C; Sánchez, S; Acal, J.A; Fontes, J. (2007), p. 13.

[8] BOE de 27 de mayo de 2006.

[9] BOE de 23 de marzo de 1996. Norma dictada en desarrollo de la Ley 35/88 sobre Técnicas de reproducción humana asistida pero que permanece vigente.

[10] BOE de 5 de julio de 2014.

[11] Art. 5.4 LTRA.

[12] Art. 5.4 LTRA, redactado por el apartado uno del artículo 8 de la Ley 26/2011, de 1 de agosto, de adaptación normativa a la Convención Internacional sobre los Derechos de las Personas con Discapacidad («B.O.E.» 2 agosto). Vigencia: 3 agosto 2011.

[13] Art. 5.5 LTRA.

[14] BOE de 23 de marzo de 1996.

[15] Datos personales; datos físicos (talla y peso); color de piel; color de ojos; color y textura del pelo; grupo sanguíneo; raza; historia médica personal (enfermedades; exposición a sustancias químicas especialmente mutágenas o teratógenas; exposición a radiaciones; historia psiquiátrica; prescripción/consumo de drogas, alcohol; historia reproductiva; número de donaciones anteriores; historia ocupacional); historia familiar; protocolo de seminograma y protocolo de estudio de ovocitos.

[16] Grupo sanguíneo; factor Rh; VDRL o prueba similar para detectar la sífilis; screening de hepatitis; test de detección de marcadores de VIH; estudio clínico para la detección de fases clínicas infectivas de toxoplasmosis, rubéola, herpes virus y citomegalovirus; y estudio clínico para la detección de neisseria gonorrhoeae y chlamydia trachomatis.

[17] BOE de 11 de noviembre.

[18] DIRECTIVA 2004/23/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 31 de marzo de 2004 relativa al establecimiento de normas de calidad y de seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos (Diario Oficial de la Unión Europea de 7 de abril de 2004).

[19] DIRECTIVA 2006/17/CE DE LA COMISIÓN de 8 de febrero de 2006 por la que se aplica la Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a determinados requisitos técnicos para la donación, la obtención y la evaluación de

células y tejidos humanos (Diario Oficial de la Unión Europea de 9 de febrero de 2006).

[20] BOE de 5 de julio de 2014.

[21] El apartado 1 del Anexo IV establece literalmente que «los criterios de evaluación clínica o de laboratorio no se aplicarán a los casos de donación de células reproductoras entre miembros de una pareja para su uso directo».

[22] Cfr. Anexo IV, apartado 3, letras a), b), c) y d).

[23] Cfr. Anexo IV, apartado 3, letras f) y g).

[24] También, González Morán, L. (1990), p. 247; Carcaba Fernández, M. (1995), p. 176.

[25] Pantaleón Prieto, F. (1988), p. 252; Ataz López, J. (1985), p. 103.

[26] Así lo entiende también respecto de la figura del «médico responsable», recogida en la Ley Básica 41/2002, de 14 de noviembre, De Las Heras García, M.A. (2005), p. 709.

[27] Cfr. arts. 6.3, 7 y 8 LTRHA.

[28] Santos Briz, J. (1995), p. 1385.

[29] Llamas Pombo, E. (2005), p. 4.

[30] Así lo pone de manifiesto Maciá Morillo, A. (2005), pp. 252 y ss.

[31] Cfr. art. 14.1 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. Sobre la naturaleza jurídica y caracteres de la historia clínica vid, Pérez Gálvez, J.F. (2006), pp. 140 y ss.

[32] La posibilidad de revocación respecto al consentimiento de la mujer aparece expresamente contemplada en la propia LTRHA. En cuanto al consentimiento del varón, la Ley española, al igual que otras homólogas europeas, guarda silencio sobre este punto. No obstante, en una reciente sentencia de 7 de marzo de 2007, el Tribunal Europeo de Derechos Humanos (TEDH) niega el derecho de una mujer a gestar los embriones concebidos «in vitro» con espermatozoides de su marido y mantenidos en estado de criopreservación, sobre la base de la negativa del mismo a que se produjera dicha transferencia. Sobre esta sentencia

vid. <http://www.biotecaweb.com> (noticia publicada el 1 de mayo de 2007).

[33] Relatado por Henrich. (1994), pp. 731 y ss.

[34] FamRZ, 1994, p. 154.

[35] Así, por ejemplo, Vidal Martínez, J. (1994), pp. 9531 y ss.;

[36] Por ejemplo, Delgado Echeverría, J. (1988), p. 216.

[37] En este sentido, Roca Trías, E. (1988), pp. 41-42; Pantaleón Prieto, F. (1989), pp. 662 y ss.; Blasco Gascó, F. (1991), pp. 702-703; Quesada González, M.C. (1994), pp. 284 y ss.

[38] Así, Montés Penadés, V.L. (1988), pp. 190 y 194; Id. (1994), pp. 972-973; Rivero Hernández, F. (1988), pp. 166-167; Hernández Ibáñez, C. (1986), pp. 495 y ss.; Lledó Yagüe, F. (1985), p. 1013.

[39] BOE nº 72 de 23 de marzo.

[40] Así opina también Carcaba Fernández, M. (1995), p. 177.

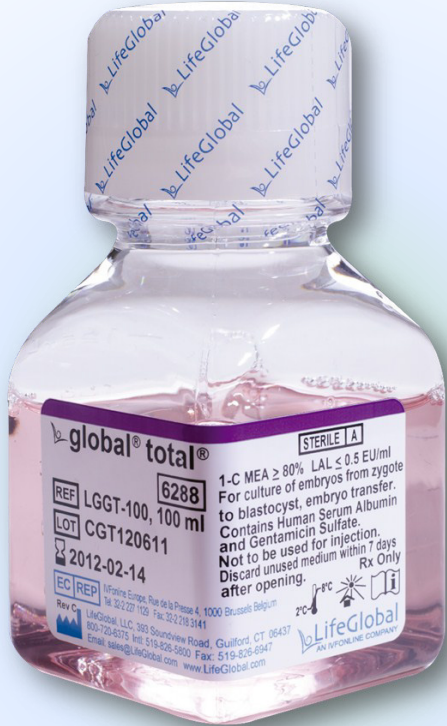
Global Total™ suplementado con Albúmina enriquecida con α y β Globulinas

“En general, recomendamos que el embrión deberá cambiarse a medio nuevo global Total cada 48 horas. Sin embargo, es posible mantener el embrión en la misma gota o largos volúmenes de medio, durante 4 días o más, dependiendo de la calidad del aire y las condiciones medioambientales en el laboratorio y en el Incubador”

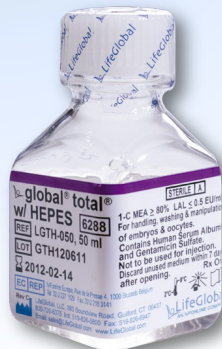
(ver Reed et al., 209;2010)

Reference: Reed ML, Hamic A, Thompson DJ, Caperton CL (2009) Continuous uninterrupted single médium culture without médium renewal versus sequencial media cultura: a sibling embryo study. Fertil Steril 92,1783-6

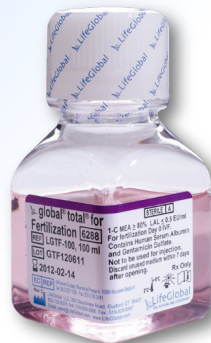
Medio único con más de 30 publicaciones certificadas, en sus más de 10 años en el mercado.



LifeGuard™
Aceite mineral de alta viscosidad



Global Total™
Fertilización



Global Total™
Hepes



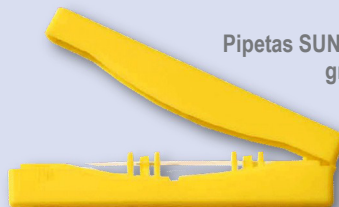
Sistema S3 para la Vitrificación de Blastocistos Humanos:

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

CCD - Aguja OPS de punción de ovocitos



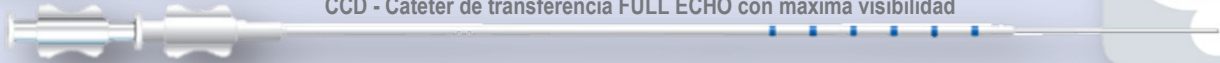
Pipetas SUNLIGHT USA para ICSI en todas las graduaciones y modelos



CCD - Catéter de transferencia PEARL TIP con esfera distal



CCD - Catéter de transferencia FULL ECHO con máxima visibilidad



Cross section view:
2 echogenic lines included
in the transparent catheter wall
(Patented technology)



MATERIAL CONSUMIBLE

Y TODO EL EQUIPAMIENTO NECESARIO PARA EL LABORATORIO FIV

SISTEMA DE BIOVIGILANCIA DE TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN ESPAÑA: EFECTOS Y REACCIONES ADVERSAS GRAVES.

Maravillas Izquierdo Martínez y Marta Cortés García.

Subdirección General de Cartera Básica de Servicios del SNS y Fondo de Cohesión.

Dirección General de Cartera Básica de Servicios del SNS y Farmacia.

Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Madrid.

mizquierdo@msssi.es; mcortes@msssi.es; sgcbfc@msssi.es

La Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo de 2004 relativa al establecimiento de normas de calidad y de seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos establece en su artículo 11 que los países pertenecientes a la Unión Europea garantizarán la existencia de un sistema que permita notificar, investigar, registrar y transmitir información sobre efectos y reacciones adversas graves que puedan influir en la calidad y seguridad de las células y tejidos, y que puedan atribuirse a la obtención, evaluación, procesamiento, almacenamiento y distribución de las células y tejidos, así como cualquier otra reacción adversa grave observada durante o a raíz de la aplicación clínica, que pueda tener relación con la calidad y la seguridad de las células y tejidos.

Cada establecimiento de tejidos, que tal y como lo define la citada Directiva para el ámbito de la reproducción humana asistida (RHA) incluye centros, servicios, laboratorios y bancos, deberá tener designada una persona responsable para la notificación a las autoridades competentes de cualquier efecto o reacción adversa grave. Esta misma Directiva en su artículo 17, determina las cualificaciones y condiciones mínimas que debe tener dicha persona y consisten en disponer de un título universitario de medicina o biología y experiencia práctica de un mínimo de dos años.

Cada establecimiento de tejidos deberá garantizar la existencia de un procedimiento preciso, rápido y

verificable que permita retirar de la distribución todo producto que pueda estar relacionado con un efecto o reacción adversa grave.

En línea con estas directrices se aprueba dos años después por la Comisión Europea la Directiva 2006/86/CE de 24 de octubre de 2006, que establece los requisitos específicos de la trazabilidad, así como un procedimiento comunitario para la notificación de los efectos y reacciones adversas graves. Además de establecer el formulario de notificación rápida ante sospechas de efectos y reacciones adversas graves, se concretan las funciones de los países. Las autoridades competentes nacionales deben garantizar que los establecimientos poseen procedimientos para comunicar tanto las sospechas de casos como las conclusiones de las investigaciones que se realicen para analizar las causas y consecuencias de este tipo de incidentes. Otra función asignada es que deben asegurar que los establecimientos notifican los casos que se originen y entregar a la Comisión Europea un informe anual sobre las notificaciones de reacciones y efectos adversos graves recibidas durante el año anterior.

Para facilitar el intercambio de información ante situaciones que involucran a varios países miembros, se crea en el año 2009 el sistema de alerta rápida de la Unión Europea en materia de células y tejidos (Rapid Alert System for human Tissues and Cells-RACT).

La trasposición de la normativa comunitaria citada al ordenamiento jurídico español dio lugar, inicialmente al Real Decreto 1301/2006 de 10 de

noviembre que, debido a una decisión del Tribunal Supremo de 30 de mayo de 2014, fue anulado por insuficiencia de rango, aprobándose posteriormente el Real Decreto-ley 9/2014 de 4 de julio, actualmente en vigor.

Mediante norma, se crea pues la obligación de un sistema específico de biovigilancia nacional cuyo objetivo final es prevenir la transmisión de enfermedades asociadas a la aplicación humana de células y tejidos, incluidas las células reproductoras, mediante la detección, recogida de información, análisis y puesta en marcha de medidas correctoras y preventivas.

Se define efecto adverso grave (EAG) como cualquier 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, a minusvalías o discapacidades o que puedan dar lugar a hospitalización o enfermedad o la pueda prolongar.

Se define reacción adversa grave (RAG) como la respuesta inesperada del donante o del receptor, incluida una enfermedad transmisible, asociada a la obtención o aplicación en el ser humano de células y tejidos, que resulte mortal, potencialmente mortal, que produzca invalidez o discapacidad, o que dé lugar a hospitalización o enfermedad o que las prolongue.

Por tanto, se hace obligatoria la notificación de incidentes graves que se puedan relacionar con la calidad y seguridad de las células y tejidos y ocurran durante alguna de

las actividades involucradas en el proceso de aplicación de las técnicas de reproducción asistida (TRA). De una forma simplificada, se debe interpretar como efectos adversos graves, los incidentes que puedan tener consecuencias graves para la salud de las personas pero no han ocurrido, y como reacciones graves, los incidentes que sí han tenido consecuencias en la salud de las personas implicadas en las TRA, ya sea donante, receptor o recién nacido.

Desde hace dos años el interés en la recopilación de información anual se ha ampliado, aunque no de forma obligatoria, a las reacciones adversas graves que suceden en las donantes de óvulos y receptoras asociadas a la aplicación de las TRA y que no tienen relación con la calidad y seguridad de las células y tejidos, como es el caso del Síndrome de hiperestimulación ovárica cuando requiere ingreso hospitalario.

Con motivo de la realización del informe anual requerido por la Comisión Europea a los Estados Miembros, durante los meses de julio de 2014 y 2015, han sido recogidos por las autoridades sanitarias de las CCAA los casos

confirmados de EAG y RAG notificados por los establecimientos de tejidos vinculados a la RHA y correspondientes al año previo.

En resumen, en 2014 se notificaron 18 casos de EAG y 51 casos de RAG (referidos al año 2013), y en 2015, 15 casos de EAG y 41 casos de RAG (referidos al año 2014). Tras el análisis de las notificaciones recibidas de todas las comunidades y ciudades autónomas con centros y unidades de RHA, se notificaron a nivel internacional 7 casos de EAG y 31 casos de RAG, en 2014 y 4 casos de EAG y 34 casos de RAG en 2015. Han sido excluidos de la notificación a la Comisión Europea casos relacionados con la aplicación de TRA que no tienen relación con la calidad y seguridad de las células y tejidos obtenidos y casos relacionados con la descendencia fruto del uso de gametos propios. Por otra parte, de los casos declarados como EAG, han sido clasificados como RAG, 7 en 2014 y, 6 en 2015.

A pesar de las importantes limitaciones constatadas en la recogida de la información mencionada, como son la cobertura de los centros y unidades notificadores, la dificultad en la

interpretación de los incidentes graves clasificados como EAG y RAG y la no disponibilidad de denominadores reales para el cálculo de tasas de incidencia, la recopilación de esta información supone un importante punto de partida para desarrollar el futuro sistema de biovigilancia nacional en materia de células reproductoras.

La incorporación de información sobre EAG y RAG en los registros de actividad obligatorios, el desarrollo de una plataforma informática de ámbito nacional y la coordinación con las autoridades sanitarias autonómicas, son tareas en las se encuentra actualmente trabajando el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, para poder disponer en breve de un sistema específico de biovigilancia, tal y como establece la normativa.

La puesta en marcha de cualquier sistema de vigilancia requiere de la participación activa de todos los agentes implicados, en este caso, del personal de los centros y servicios de RHA, laboratorios y bancos, y debe basarse en la transparencia y confidencialidad en aras de la calidad asistencial y no de la punibilidad.

MEDICIÓN Y VALIDACIÓN DE PARÁMETROS ESENCIALES EN EL LRHA: TEMPERATURA, CO₂ Y PH

Nicolás Prados Dodd
IVI Sevilla, Sevilla
nicolas.prados@ivi.es

INTRODUCCIÓN

El laboratorio de reproducción humana asistida (LHRA) es un laboratorio de apoyo al tratamiento de la infertilidad humana. Se diseña como un laboratorio dedicado al cultivo, almacenamiento y trasplante celular: espermatozoides, ovocitos y embriones humanos. El manejo de estas células se debe realizar en un ambiente definido y estable. Cambios y fluctuaciones en este ambiente puede empeorar la viabilidad de los embriones y, por tanto, el éxito del tratamiento de la pareja infértil.

Las distintas técnicas de laboratorio se pueden englobar en tres grupos: técnicas de cultivo, técnicas de crio preservación y técnicas de selección embrionaria. Aunque muchos de los esfuerzos actuales que vemos publicados se encaminan a mejorar la selección embrionaria, la base sobre la que sostiene un laboratorio son los métodos empleados en el cultivo celular. Uno de los aspectos fundamentales y que como tal es uno de los aspectos más controlados en cualquier programa de gestión de calidad del laboratorio son los parámetros del cultivo.

Las principales condiciones básicas a controlar durante en el LHRA son:

- Temperatura.
- pH (% CO₂).
- Composición del medio (medios de cultivo definidos).
- Pureza química (ausencia de compuestos orgánicos volátiles o Coves).
- Osmolaridad.

· Asepsia.

· Luz.

Estas condiciones se deben mantener durante el cultivo in vitro de las distintas muestras en el incubador, que es donde están la mayor parte del tiempo. El diseño y la climatización del laboratorio son igualmente importantes por dos motivos. El incubador no está completamente aislado sino que puede verse influenciado por la fluctuación de parámetros ambientales y, por otro lado, los embriones se sacan del incubador a lo largo del cultivo para micromanipularlos, renovar el medio de cultivo o evaluar su desarrollo, aunque sea por poco tiempo.

Esta ponencia tratará de los dos parámetros más importantes a controlar en el LRHA que son la temperatura y el pH.

TEMPERATURA: TEORÍA

Nuestro cuerpo mantiene las células a una temperatura relativamente constante alrededor de los 37 °C dentro de un proceso fisiológico llamado homeostasis. Esta temperatura varía ligeramente según el tejido, el momento del día, estados hormonales, la edad e incluso la temperatura ambiente, entre otros factores. Aunque se ha medido la temperatura del folículo, la trompa y el útero, todavía no hay certeza de la temperatura habitual del entorno del embrión in vivo.

Se sugiere el rango de 36.7 a 37.0 °C como la temperatura óptima para el cultivo in vitro. Es poco habitual el cultivo de embriones por encima de los 37.0 °C. Algunos autores sugieren que la temperatura en el ovario, las trompas o el útero pueden ser hasta 2.3

°C menor que la temperatura corporal. Sin embargo el hecho de que el cultivo in vitro es un sistema completamente distinto al in vivo lleva a tomar con precaución cultivar embriones a temperaturas inferiores a 36.5 °C.

La estabilidad de la temperatura es esencial para el cultivo con éxito de embriones. Los espermatozoides humanos son el material menos termosensible. La propia experiencia nos muestra que es posible, por ejemplo, capacitar y mantener a temperatura ambiente los espermatozoides hasta el momento de la inseminación. Probablemente blastocistos y ovocitos sean los más sensibles a los cambios durante el cultivo. In vitro, temperaturas altas activan proteínas de choque térmico que pueden afectar al desarrollo del embrión. Temperaturas más bajas inducen la despolimerización de los husos (meióticos o mitóticos) que pueden provocar anomalías cromosómicas.

CONTROL DE LA TEMPERATURA: LA REALIDAD DEL INCUBADOR

Al montar un sistema de cultivo embrionario humano in vitro debemos decidir a qué temperatura queremos cultivar los embriones y establecerlo en nuestros protocolos normalizados de trabajo. Esta temperatura no puede ser un valor fijo (por ejemplo 37.0 °C) sino que debe ser un rango de trabajo, ya que siempre existirán fluctuaciones. En el incubador sí se fija un valor que es el que nos proveerá de ese rango de trabajo.

Este rango determinará el equipamiento que necesitaremos:

Los incubadores tendrán desviaciones temporales y espaciales que deberán

estar dentro del rango fijado. Las desviaciones espaciales pueden ser mucho mayores (hasta dos grados) que las temporales (decimas de grado).

Dentro de un programa de gestión de calidad, necesitaremos equipamiento que verifique que el incubador está funcionando correctamente. Termómetros de bulbo, de termopares o de platino PT100 se han usado, aunque se debería abandonar el uso de los primeros por su falta de precisión. Existen además sistemas de medición continua que permiten controlar la temperatura en todo momento.

Nuestro rango de trabajo siempre deberá ser mayor que los rangos de fluctuación del incubador sumándole además los rangos de error del equipo de verificación. Si el equipo disponible no permite trabajar dentro de este rango debemos ampliar el rango o sustituir los equipos. Dependiendo de las características del incubador, su estado y las características del equipo de verificación podemos encontrarnos con numerosas situaciones erróneas o mal diseñadas respecto al rango de trabajo.

Probablemente cualquier rango de trabajo con un error inferior a ± 0.5 °C es impracticable con la tecnología utilizada habitualmente en el LRHA y si no se dispone de ciertos incubadores y equipos de verificación más sofisticados la temperatura de trabajo real en los laboratorios se acerca a ± 1 °C (por ejemplo, de 36 a 38 °C).

La reciente norma UNE 179007 redactada en colaboración con ASEBIR incluye la necesidad de describir y verificar estos rangos en los distintos equipos.

Otros factores que pueden afectar a la temperatura a la que se cultiva el embrión, son la apertura de puertas (que provoca un intercambio instantáneo de la atmósfera interior causando un cambio brusco de temperatura en las placas de cultivo) y el tiempo que las placas a temperatura ambiente necesitan en alcanzar el rango de trabajo.

CONTROL DE LA TEMPERATURA: LA REALIDAD DEL LABORATORIO

La temperatura de la sala donde se encuentra el laboratorio afecta a la estabilidad del control del termostato del incubador. Por ese motivo el laboratorio de LHRA debe tener una climatización que permita tener una temperatura estable y constante durante todo el periodo de funcionamiento del incubador. Cambiar la temperatura de la sala según la época del año o, especialmente, apagar la climatización durante la noche o los periodos sin actividad asistencial afecta la temperatura del interior del incubador (y cualquier aparato que esté termoregulado dentro del laboratorio).

Es igualmente importante el control de las superficies calefactadas en pletinas de microscopio y cabinas de flujo laminar, diseñadas para evitar que se enfríen las placas de cultivo expuestas a la temperatura ambiente. Existen dos estrategias para el control de estas superficies. La más habitual (ajustar la temperatura de la superficie según la temperatura de la gota del cultivo donde se encuentra el embrión) conlleva una serie de riesgos en la medida. Otra estrategia, ajustar la superficie a un rango de trabajo de un grado por encima de la temperatura de trabajo del incubador es mucho más fácil de implementar y evita una serie de errores que pueden llevar a calentar o enfriar de más las placas.

Finalmente no se debe olvidar el control de las neveras donde se almacena el medio de cultivo. De nuevo, el uso de equipamiento inadecuado y un control erróneo aumenta el riesgo de que se congelen o atemperen puntualmente los medios de cultivo causando su deterioro.

PH: TEORÍA

Las reacciones metabólicas en el interior celular requieren un determinado pH interno. Existe un fino mecanismo de control de este pH interno que depende a su vez en gran medida del pH del exterior celular. En nuestro cuerpo existe un sistema de homeostasis que no presenta el medio de cultivo al que

se encuentra expuesto el embrión durante su cultivo in vitro. No existe consenso en el valor del pH intracelular del embrión y se ha descrito alrededor de 7,1 o 7,4. El pH del medio exterior in vivo se ha descrito entre 7.2 y 7.5. Está mediado por una anhidrasa y un tampón bicarbonato/ CO_2 . En el cultivo in vitro, la estabilidad del pH extracelular afecta aún más al pH interno y por tanto es esencial su control para no perjudicar la viabilidad de los embriones.

Durante el cultivo in vitro en el incubador, se utiliza un sistema bicarbonato/ CO_2 y se toma como referencia los valores entre 7.3 y 7.4 habitualmente. Sin embargo, pequeños cambios en el pH representa variaciones grandes en la concentración de H^+ con lo que, al igual que la temperatura, el pH debe ser lo más estable posible.

% CO_2 : TEORÍA

El incubador controla el pH del medio de cultivo regulando el porcentaje de CO_2 .

La ecuación de Henderson-Hasselbalch describe la relación entre el bicarbonato e hidrogeniones presentes en el medio y el CO_2 . Existen nomogramas que facilitan estimar los valores de pH según la concentración de bicarbonato del medio y % CO_2 del incubador. Es muy importante tener en cuenta otros factores que afectan esta relación: la altitud del laboratorio.

% CO_2 : LA REALIDAD

Hasta hace unos años la tecnología de los incubadores y los aparatos de medida presentaban errores altos. Los nuevos sensores son más fiables siendo más rápidos e independientes de la presencia de humedad en el ambiente. Existen además sensores que permiten una lectura continua, monitorizando cada pocos minutos la concentración del incubador. Otro de los factores a tener en cuenta es que la mayoría de los incubadores utilizan algoritmos para indicar el % CO_2 de manera que infravalora el descenso en concentración tras aperturas de puertas.

También ha habido un cambio en la concentración fijada en el incubador del 5% al 6% sin haber cambiado la formulación de los medios. Con los actuales medios comerciales de cultivo es un riesgo cultivar embriones al 5% CO₂.

Al control de este parámetro hay que sumar también el del %O₂ ya que se está cultivando cada vez más a baja tensión de oxígeno (por debajo del 20% ambiental).

PH: LA REALIDAD

El pH es uno de los parámetros que todos los manuales de embriología clínica humana insisten que juega uno de los papeles más importantes y casi todos los LHRA lo tratan de medir y controlarlo. Muchas veces infructuosamente. Existen básicamente dos métodos para medir el pH:

Colorimétricos/fluorescencia.

Electrodos de membrana (se basan en el intercambio de iones).

Existen numerosas variantes aplicables al LHRA con cada método, con sus ventajas e inconvenientes, pero salvo los métodos más caros existe cierta variabilidad entre operadores. Existen muchos factores que pueden alterar la medida del pH: volumen de alícuota, contenedor de la alícuota, tiempo de equilibrado, temperatura de la sonda externa y de sus calibradores, tamaño de la sonda y tiempo en tomar la medida, concentración de aminoácidos y albúmina, presencia de

aceite mineral... Factores que hacen que una técnica, que se supone que es una de las básicas que todo embriólogo debe poder hacer, sea una de las más variables y desconcertantes.

PH FRENTE CO₂

Estos parámetros miden cosas distintas. Entenderlo nos lleva a seleccionar qué medir y cuándo. El pH es un reflejo del estado del medio de cultivo en equilibrio y al que le afecta principalmente el %CO₂, la composición del medio de cultivo y la albúmina del medio de cultivo. El %CO₂ nos está midiendo el funcionamiento correcto del incubador en el momento de la medida. Es por ello más relevante el control continuo del % CO₂ que el del pH que podría reducirse a un control de lotes de cultivo o una prueba secundaria para cuando se presenten resultados fuera de rango en otros parámetros.

Si tenemos en cuenta que:

los medios de cultivo actuales están bien definidos y cumplen los controles de calidad de los fabricantes, es engorroso, complicado, variable y/o costoso medir el pH y que actualmente es inviable medir directamente el pH de la gota de cultivo donde se encuentra el embrión (igual que no se mide su temperatura), podemos decir que no es una prioridad medir el pH de los medios de cultivo de forma continua en el LHRA.

Sin embargo existen una serie de ventajas que sugiere que es una técnica que todo laboratorio debe ser capaz de medir correctamente:

Detectar alteraciones en el medio de cultivo provocados por su incorrecta manipulación en el laboratorio o durante el transporte.

Detectar anomalías ocultas en el incubador.

Ser capaz de poner a punto una técnica engorrosa, complicada y variable implica entender las bases teóricas y prácticas del control del pH en el medio.

En resumen, la temperatura es un parámetro fácil de controlar y verificar con el equipamiento y los conocimientos adecuados. El pH es un parámetro que afecta directamente a la viabilidad del embrión y es interesante ser capaz de conocer el pH que presenta el medio de cultivo. Sin embargo su medida es compleja y presenta numerosos problemas. El % CO₂ en el incubador es la manera en la que garantizamos que haya un correcto pH en el medio de cultivo. Su medición es sencilla y nos permite comprobar el correcto funcionamiento del incubador en todo momento.

No ha sido objeto de esta ponencia el control de otro aspecto muy importante a controlar en el LRHA que es la presencia de COVs. El resto de parámetros, como los medios de cultivo, la osmolaridad, la asepsia o la luz, actualmente no presentan realmente un problema pues se controlan adecuadamente, su impacto es mínimo o no existen todavía suficientes pruebas como para estandarizar su uso en todos los laboratorios.

DANCING WITH THE CHROMOSOMES TOWARDS BLASTOCYST

Luca Gianaroli
S.I.S.Me.R. Reproductive Medicine Unit, Bologna, Italy

Several studies demonstrated that aneuploidy is one of the factors which significantly affect embryo implantation. For this reason, it is extremely important to develop new techniques in order to allow detection of chromosomal abnormalities in a reliable and safe way. Furthermore, it is necessary to clearly understand how chromosomes segregate at meiosis and at initial mitoses in order to define the chromosomal status of the blastocysts that will be generated.

The range of preimplantation genetic diagnosis and screening techniques available, as well as their effectiveness and safety has been increasing through the years and new technologies that are currently being developed make it realistic

to expect further improvements in the near future.

PGD was first applied to ART more than 20 years ago and since then it has contributed to the birth of more than 6000 babies according to the data collected and elaborated by the ESHRE PGD consortium. Analysis of polar bodies or embryonic cells are extremely useful techniques to allow couples at high reproductive risk (such as carriers of genetic disorders or translocations) to avoid the transmission of severe pathological conditions to their offsprings.

The field of molecular biology is constantly evolving and it is currently offering continuous innovations, such

as the microarray technique by which a great range of genes and the whole chromosome set can be screened.

Next generation sequencing is a new technique which is currently being fine tuned, and due to its specific characteristics it is reasonable to expect that it might be applied to ART shortly in order to increase the chances of conception of healthy offsprings. New perspectives in this field also derive from recently-published data on the analysis of blastocoelic fluid (BF), which, according to accurate studies, reflects the chromosomal status of the corresponding blastocyst in the large majority of cases, thus allowing to predict its ploidy condition.

NACEN LAS NUEVAS TECNOLOGÍAS QUE REVOLUCIONAN EL TRATAMIENTO DE LA FERTILIDAD

Genea
BIOMEDX
Geri

tec
& p

LEADING TH
FUTUR

TECNO

GERI15003 (Octubre 2015)

Merck Serono | *Juntos hacemos posible la fertilidad.*

Información reservada a profesional sanitario. Eeva, Geri y Gavi son conforme con la legislación vigente de productos sanitarios. Para más información consulte las instrucciones de uso.

Merck Serono

va™

Genea
BIOMEDX
Gavi

IVF Lab
Technologies
Procedures

TECHNOLOGICAL
IN FERTILITY

```
1010 1000 0111  
0100 1010  
0111 0100 0111  
1000 0100  
1010 1010 1000  
0111 0100 0111
```

LOGÍA PARA LA VIDA

Merck Serono Fertility Technologies





**COMUNICACIONES
ORALES**

CO-001: EFECTO DE LA CONGELACIÓN DE ESPERMATOZOIDES NO SELECCIONADOS SOBRE LA INTEGRIDAD DEL ADN ESPERMÁTICO EN MUESTRAS NORMOZOOSPÉRMICAS

A. Barberá Alberola, J. Bataller Sanchez, M. Tormos Berenguer, M. Ruiz Jorro
CREA, Valencia
antonio.barbera@creavalencia.com

INTRODUCCIÓN:

Los métodos de criopreservación de muestras seminales son utilizados ampliamente en los laboratorios de reproducción, tanto en donantes de semen como en pacientes que necesitan preservar su fertilidad. El daño producido por el proceso de congelación y descongelación al espermatozoide tiene lugar a distintos niveles estructurales y/o funcionales, afectando sobre todo a la movilidad. Sin embargo, el efecto que este proceso puede tener sobre la integridad del ADN no está totalmente estudiado. El estudio de la fragmentación del ADN (FrADN) y de la variación de este parámetro a lo largo del tiempo, puede revelar cómo afectan los procesos de congelación a las células espermáticas.

OBJETIVOS:

El objetivo del presente estudio es evaluar el efecto de la congelación lenta en vapores de nitrógeno líquido sobre la integridad y longevidad del ADN de espermatozoides no seleccionados.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se han analizado un total de 12 muestras normozoospermicas de donantes de semen. Las muestras fueron obtenidas y analizadas siguiendo los criterios OMS?V. Cada muestra se separó en 2 alícuotas: una para la valoración de la fragmentación del ADN espermático y longevidad tras congelación-descongelación (muestra C-D) y otra para la misma valoración, previa a la congelación (muestra F). Tanto la muestra en fresco como la post congelación-descongelación, se dividieron su vez en tres alícuotas, t0, t2 y t24, tras realizar recuperación de espermatozoides móviles mediante

centrifugación por gradientes de densidad (CGD), para la valoración de la FrADN basal, a las 2 horas y a las 24 horas, respectivamente.

La congelación se llevó a cabo en vapores de nitrógeno líquido, utilizándose Test Yolk Buffer (Irvine Scientific) en proporción 1:1 y pajuelas termosellables de alta seguridad (CBS).

Una vez fijada cada alícuota (formaldehído 4%), se analizó el porcentaje de espermatozoides con fragmentación del ADN (%FR) mediante TUNEL. Se analizaron al menos 500 espermatozoides mediante epifluorescencia.

RESULTADOS:

El %FR en las muestras previas a la congelación fue: t0 11,00 ± 3,47; t2 13,77± 4,26 ; t24 17,38± 7,33.

El % FR de las muestras tras la descongelación fue: t0 26,39± 9,89; t2 35,59± 11,70; t24 44,34±14.

El incremento de %FR por hora para las muestras previas a la congelación fue:1,39/h. ±1,19 para las 2 primeras horas, y 0,27/h. ±0,23 para las 24 horas totales.

El incremento de %FR por hora para las muestras tras la descongelación fue:4,10/h. ±4,66 para las 2 primeras horas, y 0,75/h. ±0,55 para las 24 horas en total.

Se realizó Anova multifactorial para comprobar las diferencias de %FR entre las muestras previas a la congelación y post-descongelación, a nivel inicial (t0), pasadas 2 horas (t2) y tras 24 horas (t24).

Se han encontrado diferencias significativas entre los valores de %FR de las muestras congeladas y sin congelar (0,00; P valor < 0,05). También se observan diferencias entre el incremento dinámico de %FR antes y después de congelar (0,046; P valor < 0,05).

CONCLUSIONES:

Nuestros resultados indican que la congelación de espermatozoides no seleccionados (muestra completa) en vapores de nitrógeno líquido, incrementa significativamente el porcentaje basal de espermatozoides con ADN fragmentado (t0) y reduce su longevidad.

Esta diferencia entre la fragmentación en la muestra en fresco y la muestra congelada podría ser debida no solo al proceso de congelación, sino también al hecho de que en la primera se realizó una CGD previa al TUNEL. En estudios previos publicados por nuestro grupo, no encontramos diferencias significativas en la fragmentación del ADN espermático al congelar espermatozoides previamente seleccionados por CGD.

Son necesarios más estudios para evaluar el impacto de la congelación sobre espermatozoides, tanto seleccionados como no seleccionados, así como el efecto que pueda tener la congelación sobre la integridad y longevidad del ADN espermático.

BIBLIOGRAFÍA:

Sherman JK. *Synopsis of the use of frozen human semen since 1964: state of the art of human semen banking. Fertility and Sterility.* 1973; 24 (5):397-412.

Krausz C, Forti G. Sperm Cryopreservation in male infertility due to genetic disorders. *Cell Tissue Bank.* 2006; 7(2):105-12.

Said TM, Gaglani A, Agarwal A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive Biomedicine Online.*2010; 21(4):456-462.

Isachenko E, Isachenko V, Sanchez R, et al. Cryopreservation of spermatozoa: Old routine and new perspectives. En: Donnez J, Kim S, eds. *Principles and Practice of Fertility Preservation.* Cambridge:

Cambridge University Press, 2010.

Isachenko E, P. Mallmann, G. Rahimi, J. Risopatròn, M. Schulz, V. Isachenko and R. Sánchez. *Vitrification Technique - New Possibilities for Male Gamete Low-Temperature Storage.* *Current Frontiers in Cryobiology.* Prof. Igor Katkov (Ed.); 2012.

Sergerie M, Laforest G, Boulanger K, Bissonnette F, Bleau G. Longitudinal study of sperm DNA fragmentation as measured by terminal uridine nick end-labeling assay. *Human Reproduction* 2005;20:1921-7.

Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Human Reproduction* 2005; 20:3446-51.

Thomson LK, Fleming SD, Schulke L, Barone K, Zieschang JA, Clark AM. The DNA integrity of cryopreserved spermatozoa separated for use in assisted reproductive technology is unaffected by the type of cryoprotectant used but is related to the DNA integrity of the fresh separated preparation. *Fertility and Sterility.*2009;92(3):991-1001.

CO-002: ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II TIPO 2 EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS Y SU IMPLICACIÓN EN LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA

M. Gianzo Citores (1), I. Muñoa Hoyos (1), I. Urizar Arenaza (1), H. Estonba Iturriza (1), Z. Larreategui Laiseca (2), J. Irazusta Astiazaran (1), N. Subirán Cuidad (1).

(1) Universidad del País Vasco (UPV/EHU), (2) Clínica IVI Bilbao.

marta.gianzo@ehu.eus

INTRODUCCIÓN:

Uno de los factores considerado como esencial en la fertilidad masculina es la movilidad espermática. De hecho, el uso de espermatozoides con buena movilidad en las técnicas de reproducción asistida, muestra mejores resultados de tasas de fecundación, calidad embrionaria y tasas de gestación. La movilidad espermática está determinada por la actuación conjunta de diversos sistemas moleculares, entre los cuales se encuentra el sistema renina-angiotensina. Se han descrito varios componentes del sistema renina-angiotensina en espermatozoides humanos, como el receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1R), la enzima convertidora de angiotensina (ACE), la neprilisina o la aminopeptidasa N. Sin embargo se desconoce completamente la presencia y función del receptor de Angiotensina II tipo 2 (AT2R). En este estudio se describe por primera vez la presencia de AT2R en las espermatozoides humanos, así como su importancia en el mantenimiento de la movilidad espermática.

OBJETIVOS:

Evaluar la presencia de AT2R en espermatozoides humanos y valorar su implicación en la fertilidad espermática.

MATERIAL Y MÉTODOS:

se usaron 97 muestras seminales humanas, procedentes de la Clínica IVI Bilbao, entre Febrero y Diciembre de 2014. Todas las muestras fueron examinadas y clasificadas según directrices de la OMS (OMS, 2010). Para confirmar la presencia de AT2R

en los espermatozoides se llevaron a cabo estudios de RT-PCR, Western blot e inmunofluorescencia. Los niveles de AT2R se determinaron mediante citometría de flujo y se compararon con los parámetros seminales de concentración y movilidad espermática. Estadísticos: análisis de kolmogorov-Smirnov, Kruskal-Wallis seguido de U-Mann-Whitney, Correlaciones de Spearman y Curvas ROC.

RESULTADOS:

En este estudio, se demuestra por primera vez la existencia de AT2R en espermatozoides humanos mediante análisis de RT-PCR, Western blot y citometría de flujo. Además, estudios de inmunofluorescencia muestran que este receptor se encuentra localizado principalmente en el segmento ecuatorial de la cabeza espermática. Por otra parte, también se demuestra que los niveles de AT2R están relacionados con los parámetros seminales de concentración y movilidad. Concretamente, hay una correlación positiva significativa entre la concentración espermática de las muestras seminales y los niveles de AT2R, tanto en las muestras en fresco como tras su capacitación ($p < 0,01$ y $p > 0,01$). En cuanto a la movilidad, hay una correlación positiva significativa entre los niveles de AT2R de las muestras seminales y el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva, tanto en las muestras en fresco como tras su capacitación ($p < 0,01$ y $p < 0,01$). Asimismo, existe una correlación negativa significativa entre los niveles de AT2R y el porcentaje de espermatozoides inmóviles, en las muestras en fresco y tras su capacitación ($p < 0,05$ y $p < 0,01$). En

lo referente a su relación con las distintas patologías seminales, los niveles de AT2R son menores en varones astenozoospermicos en comparación a varones normozoospermicos ($< 0,05$). El análisis de la curva ROC muestra diferencias significativas entre las muestras normales (72,81%-espermatozoides positivos para AT2R) y las astenozoospermicas (<72,81%-espermatozoides positivos para AT2R). De forma que AT2R posee una significación clínica en la diferenciación de muestras normozoospermicas y astenozoospermicas.

CONCLUSIONES:

En este estudio se demuestra que AT2R se expresa en los espermatozoides humanos y que está implicado en la movilidad espermática. Además los niveles de AT2R son menores en los pacientes astenozoospermicos en comparación con los normozoospermicos. En base a estos hallazgos, AT2R podría ser usado como diana terapéutica en la búsqueda de la infertilidad masculina y además, debido a su significación clínica, podría tener valor como herramienta diagnóstica de muestras astenozoospermicas. Un conocimiento más profundo de las proteínas relacionadas con la movilidad espermática podría ayudar a esclarecer el papel de éstas en la fertilidad del varón a la vez que permitiría establecer biomarcadores de infertilidad masculina.

BIBLIOGRAFÍA:

Bhilawadikar R, Zaveri K, Mukadam L, Naik S, Kamble K, Modi D, et al. Levels of Tektin 2 and CatSper 2 in normozoospermic

and oligoasthenozoospermic men and its association with motility, fertilization rate, embryo quality and pregnancy rate. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:513-23.

Kohn FM, Muller C, Drescher D, Neukamm C, el Mulla KF, Henkel R, et al. Effect of angiotensin converting enzyme (ACE) and angiotensins on human sperm functions.

Andrologia 1998;30:207-15.

Subiran N, Pinto FM, Agirregoitia E, Candenás L, Irazusta J. Control of APN/CD13 and NEP/CD10 on sperm motility. *Asian J Androl* 2010;12:899-902.

Vinson GP, Mehta J, Evans S, Matthews S, Puddefoot JR, Saridogan E, et al.

Angiotensin II stimulates sperm motility. *Regul Pept* 1996;67:131-5.

Vinson GP, Puddefoot JR, Ho MM, Barker S, Mehta J, Saridogan E, et al. Type 1 angiotensin II receptors in rat and human sperm. *J Endocrinol* 1995;144:369-78.

CO-003: INFLUENCIA DE LA MONOTERAPIA CON DARUNAVIR/RITONAVIR EN LA CALIDAD SEMINAL EN PACIENTES CON VIH.

ML. López Regalado(1), MC. Gonzalvo López(1), A. Clavero Gilabert(1), A. Benítez Martín(1), M. Luengo Diaz(1), P. Navas Bastida(1), I. Sánchez Castelló(1), A. Guzmán Olmedo(1), V. Díaz Prado(1), L. Martínez Navarro(1), MA. López Ruz (2)

(1)Unidad de Reproducción. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada. (2) Unidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada

marisalopezregalado@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

Existen discrepancias en la literatura del efecto de la infección VIH y de los distintos tratamientos utilizados en estos pacientes sobre los parámetros seminales. Datos de la época de triterapia antiretroviral de gran actividad (TARGA) frente al VIH demostraron que la triterapia con análogos de nucleósidos reducía el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos. Se desconoce el efecto de las nuevas terapias de más fácil adherencia sobre la calidad seminal de pacientes VIH.

OBJETIVOS:

Evaluar los cambios producidos en la calidad del semen en pacientes VIH que estando en tratamiento con triple terapia, inician monoterapia con darunavir/ritonavir.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio observacional con pacientes VIH, con carga viral indetectable en plasma sanguíneo bajo triple terapia que incluye 2 análogos de nucleósidos y que son subsidiarios de pasar

a monoterapia con un inhibidor de la proteasa potenciado (darunavir/ritonavir). Los criterios de inclusión fueron los siguientes: pacientes varones con carga viral plasmática indetectable (< 20 copias) en triterapia que incluya análogos y mayores de 18 años que den su consentimiento informado por escrito. Las variables analizadas fueron: edad, CD4 /ml, nadir CD4, tipo de triterapia, viscosidad semen, aspecto, licuefacción, volumen, pH, concentración de espermatozoides, movilidad progresiva y total, vitalidad, Ac anti-VHC, Ac anti-VHB, FSH, LH, Testosterona, alcohol, tabaco, antecedentes andrológicos y antecedentes reproductivos. En cada paciente se analizan dos muestras de semen separadas 15 días, antes de abandonar el tratamiento con triterapia, y otras dos muestras tras 48 semanas de estar en tratamiento con monoterapia de darunavir/ritonavir. Todas las muestras de semen se manejan y evalúan siguiendo las recomendaciones de la OMS 2010.

RESULTADOS:

Se incluyeron un total de 28 pacientes, la edad media fue de $41 \pm 9,13$ años

(22-55). El porcentaje de pacientes con valores superiores al límite inferior de referencia de la OMS 2010 para todos los parámetros de semen fue similar antes y después del paso a monoterapia: normozoospermia (57,1% vs 61,9%), oligoteratozoospermia (7,1% vs 9,6%), oligoastenozoospermia (7,1% vs 4,8%), oligoteratoastenozoospermia.

(10,7% vs 4,8%), teratozoospermia (14,3% vs 4,8%), astenozoospermia (0% vs 9,6%), oligozoospermia (3,6% vs 4,8%). No se observaron diferencias significativas en las variables de calidad cuantitativas del semen al inicio y a las 48 semanas de estar en tratamiento con monoterapia, siendo el nº total de espermatozoides medio/eyaculado ($201,6 \pm 165,9$ vs $161,5 \pm 133,3$), movilidad progresiva media ($51,3 \pm 18,4$ vs $51,3 \pm 15,0$), movilidad total media ($59,4 \pm 17,9$ vs $59,0 \pm 13,8$) y la media de formas normales ($4,71 \pm 2,1$ vs $5,3 \pm 2,7$).

CONCLUSIONES:

El cambio de triterapia a monoterapia con darunavir/ritonavir no altera la calidad seminal.

CO-004: UTILIDAD DE LA SELECCIÓN MAGNÉTICA DE CÉLULAS (MACS) EN MUESTRAS SEMINALES UTILIZADAS EN INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

M. Ballester Ferrer, M. Boada Palà, S. Mateo Cuadros, R. Buxaderas Sánchez, JM. Vendrell Sala, A. Veiga Lluch
Hospital Universitario QUIRÓN DEXEUS, Barcelona
balmar@dexeus.com

INTRODUCCIÓN:

Una correcta selección espermática es necesaria para obtener buenos resultados clínicos en las técnicas de reproducción asistida (TRA). El resultado de la inseminación intrauterina (IUI) está en relación directa con la calidad seminal. Estos pueden verse comprometidos por la presencia de una elevada cantidad de espermatozoides apoptóticos en el eyaculado siendo ésta más frecuente en varones infértiles. Se ha descrito que la utilización de micropartículas magnetizadas y conjugadas con Anexina V (MACS) permite seleccionar los espermatozoides no apoptóticos para su uso en TRA ya que retiene aquellos que han externalizado la fosfatidilserina.

OBJETIVOS:

Valorar si la preparación de las muestras seminales de las IUI eliminando los espermatozoides apoptóticos mediante la combinación de gradientes de densidad (GD) y MACS mejora los resultados en cuanto a tasa de embarazo (TE) y tasa de niño vivo en casa (RNV).

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio prospectivo de 566 ciclos de IUI realizados a 326 parejas, de Junio 2012 a Marzo 2014. Los ciclos se distribuyeron aleatoriamente en dos

grupos: grupo estudio (MACS) y grupo control (NO MACS). La preparación de la muestra de semen en ambos grupos fue mediante GD. Un conteo total de espermatozoides post GD < 105 se aplicó como criterio de exclusión para el estudio.

En el grupo MACS, la fracción post capacitación fue procesada mediante MACS según protocolo (MACS® GMP, Milteny Biotec). En el grupo NO MACS, la fracción final de espermatozoides post capacitación fue la utilizada para la inseminación.

Se comparó la tasa de embarazo, aborto y niño vivo nacido entre los dos grupos. Las variables cualitativas o nominales se compararon mediante el Test Chi-cuadrado o el Test exacto de Fischer y las variables continuas se compararon mediante la U-Mann-Whitney.

RESULTADOS:

De los 566 ciclos de IUI, 357 fueron del grupo MACS (63,1%) y 209 del grupo NO MACS (36,9%).

No existían diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en cuanto a la edad media del varón ($36,32 \pm 4,34$ vs $36,61 \pm 4,50$) ni al número de espermatozoides con movilidad progresiva inseminados ($28,6 \times 10^6 \pm 30,97$ vs $32,08 \times 10^6 \pm 48,11$).

Tampoco existían diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en la edad media de la mujer ($34,35 \pm 3,46$ vs $34,78 \pm 3,53$), FSH basal ($7,05 \pm 2,41$ vs $6,91 \pm 1,78$ U/l), Estradiol basal ($50,99 \pm 32,64$ vs $54,52 \pm 33,90$ pg/ml), número de ciclos previos realizados ($0,69 \pm 0,84$ vs $0,82 \pm 0,89$) y dosis de Gonadotropinas administradas ($500,30 \pm 309,98$ vs $495,24 \pm 266,70$ U/l).

La TE y de RNV obtenida en el grupo MACS fue del 16,2% y 12,9% respectivamente vs 17,7% y 15,3% en el grupo NO MACS, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellas. Tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas en la tasa de aborto siendo 19% en el grupo MACS y del 10,8% en el grupo NO MACS.

CONCLUSIONES:

- La preparación espermática para IUI utilizando la combinación de GD y MACS no presenta ventajas frente a la preparación únicamente con GD.
- De los resultados obtenidos no puede descartarse la posible utilidad de las MACS para otras técnicas y/o indicaciones como FIV/ICSI en pacientes con elevada fragmentación del ADN espermático.

CO-005: EL USO DE ESPERMATOZOIDES TESTICULARES INCREMENTA LOS RESULTADOS REPRODUCTIVOS EN PACIENTES CON PATRÓN DE PROTAMINAS ALTERADO

M. Guijarro Notario, M. Fernández, L. Medrano, E. Rocafort, A. Leza, B. Ramos, L. García, I. Vilella, J. Aizpurua
IVF Spain, Alicante
m.guijarro@ivf-spain.com

INTRODUCCIÓN:

Las protaminas 1 y 2 reemplazan alrededor del 85% de las histonas de unión a ADN en células espermáticas para proteger la integridad del ADN. En hombres fértiles, el ratio de protaminas es aproximadamente 1:1. El desequilibrio entre estas poblaciones se ha relacionado en algunos estudios con infertilidad y podría ser utilizado como marcador para determinar el resultado de un ciclo de reproducción asistida. Es posible que este desequilibrio entre las poblaciones de protaminas provoque, entre otros, una mayor susceptibilidad a daño en el ADN espermático, generando un deterioro del mismo durante el tránsito del espermatozoide desde el testículo a la vagina. El empleo de espermatozoides recuperados directamente de testículo podría mejorar los resultados en este tipo de pacientes al emplear espermatozoides no dañados desde este punto de vista.

OBJETIVOS:

El objetivo es determinar si los espermatozoides procedentes de aspiración testicular (TESA) producen mejor resultado en cuanto a tasas de fecundación, formación de blastocisto e implantación, en parejas de ovodonación en las que se ha diagnosticado un ratio anormal de protaminas, en base a malos resultados reproductivos previos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio unicéntrico, comparativo prospectivo desde enero de 2014 a abril de 2015 que incluye a 28 parejas que ya se han sometido al menos a un ciclo previo de ovodonación con espermatozoides de eyaculado. Se estudia el ratio de protaminas con el test FertiCert® cuando se observa una tasa de blastocistos nula o muy baja y no se consigue embarazo. En aquellos casos con patrón de protaminas alterado se indica TESA para el siguiente ciclo de ovodonación, microinyectándose el 50% de los ovocitos con espermatozoides de eyaculado en fresco y el otro 50% con espermatozoides de TESA. Se compararon tasas de fecundación, formación de blastocisto, blastocisto de buena calidad y tasa de implantación. Se realizó cultivo a blastocisto en todos los casos. La selección embrionaria para la transferencia se realizó exclusivamente basada en su morfología según criterios de ASEBIR, y no en la procedencia del espermatozoide. Para los resultados clínicos, sólo se tuvieron en consideración aquellos casos en los que los blastocistos transferidos provenían del mismo origen espermático. Para el análisis estadístico se aplicaron los test T de Student y Chi-cuadrado utilizando el software SPSS.

RESULTADOS:

Se observó una tasa de fecundación significativamente mayor con TESA al compararla con eyaculado (83.6% frente a 68.5%, $p=0.007$). La tasa de

formación de blastocisto observada en el grupo de TESA es también significativamente mayor que en los casos de eyaculado (42.9% frente a 17.2%, $p=0.004$), y también lo es la tasa de formación de blastocistos de buena calidad (30.9% frente a 8.1%, $p=0.005$). Al analizar la tasa de implantación en aquellos casos en los que se transfirieron embriones procedentes de TESA (75.0%) frente a aquellos en los que se transfirieron blastocistos procedentes de eyaculado (12.5%) también resultó estadísticamente significativa ($p=0.002$).

CONCLUSIONES:

Nuestros resultados indican que es posible mejorar los resultados reproductivos en pacientes con patrón de protaminas alterado, empleando para ello espermatozoides obtenidos directamente de testículo. Nuestro programa de ovodonación reduce el factor ovocitario como posible casusa de malos resultados. Es difícil determinar si la mejoría en el resultado del ciclo se debe al grado de compactación del ADN o a factores epigenéticos. Estos datos además corroboran la relación entre ratio de protaminas e infertilidad, y también sugieren que una fuente alternativa de espermatozoides puede resultar en una gran mejora de las tasas de fecundación y formación de blastocistos, y por tanto, en el resultado final del ciclo. Este estudio aporta una nueva opción terapéutica antes de reemplazar el gameto masculino.

CO-006: COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBSTÉTRICOS Y PERINATALES DE GESTACIONES ÚNICAS PROCEDENTES DE UN ESTUDIO PROSPECTIVO ALEATORIZADO; TIME LAPSE FRENTE A INCUBADOR CONVENCIONAL

T. Viloría Samochin, F. Insua, A. Galán, V. Serra, A. Cobo, M. Meseguer
IVI Valencia, Valencia
thamara.viloria@ivi.es

INTRODUCCIÓN:

La introducción del Time Lapse (TL) en la evaluación morfológica del embrión, nos ha permitido conocer el tiempo de divisiones celulares embrionarias, su relación con la viabilidad y su potencial de implantación. Sin embargo, hasta el momento no se habían informado datos neonatales derivados de la utilización del TL como incubadora y método de selección embrionaria.

OBJETIVOS:

Comparar los resultados obstétricos y perinatales de embriones cultivados en incubadores monitorizados por TL, con aquellos cultivados en incubadores convencionales (IC) en ciclos propios y de ovodonación procedentes de un estudio prospectivo aleatorizado.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Análisis secundario de un estudio controlado prospectivo aleatorizado que incluyó 856 pacientes entre Febrero de 2012 y Julio de 2013; de las cuales 378 lograron embarazo, habiendo estado 216 de ellas en TL (Embryoscope® Vitrolife) y 162 en IC. Las transferencias embrionarias fueron realizadas en día 3 ó 5/6 de desarrollo. Posteriormente se compararon ambos grupos. El análisis estadístico fue realizado utilizando la prueba T y Chi-cuadrado para detectar diferencias significativas.

RESULTADOS:

Todos los resultados están expresados con un Intervalo de Confianza del 95% y comparando TL Vs IC (siempre en ese orden). No se observaron diferencias significativas respecto a las características basales de la población estudiada en ambos grupos: edad materna 34,6 años (34,2-34,9) Vs 34,7 (34,2-35,1), edad media de las donantes 26,1 años (25,3-26,9) Vs 25,4 (24,4-26,4), dosis total de gonadotropinas en donantes 2088 UI (1953-223) Vs 2124 (1976-2272), dosis total de gonadotropina en pacientes 2230 UI (2077-2383) Vs 2297 (2103-2491), respecto a los días de estimulación 10,3 (9,9-10,7) Vs 10,6 (10,2-11,0), con un número total de ovocitos MII de 10,6 (10,02-10,09) Vs 11,0 (10,5-11,4). Respecto a las transferencias embrionarias realizadas en día 3 (65,7% Vs 74,1%) o en blastocisto (34,3% Vs 25,9%); media de embriones transferidos 1,88 (1,83-1,93) Vs 1,91 (1,86-1,96). La tasa de parto único fue de 49,3% Vs 40,0%, mientras que la tasa de parto gemelar fue mayor en grupo de TL 31,0% (67/216) Vs 24,7% (40/162), sin embargo no resultó estadísticamente significativo.

Cuando se analizaron los embarazos únicos, no se encontraron diferencias entre ambos grupos respecto a la tasa de complicaciones obstétricas: sangrado en el 1er trimestre 14,8% Vs 10,7%, colestasis gestacional 3,4% Vs 4,1%, sangrado en 2do y 3er trimestre 6,0% Vs 4,1%, hipertensión inducida por el embarazo 12,1% Vs 14,8%.

La media de semanas al momento del parto fue de 38,8 (38,4-39,1) Vs 39,5 (38,0-38,9), nacimientos prematuros (<37 semanas) 10,7% Vs 12,3% y partos muy prematuros (<34 semanas) 2,9% Vs 3,3%. No se hallaron diferencias estadísticas respecto a parámetros neonatales: peso al nacer (gr) 3163 (3035-3292) Vs 3074 (2913-3236), bajo peso al nacer (<2500gr) 12,8% Vs 12,3%, muy bajo peso al nacer (<1.500gr) 2,0% Vs 2,4%, altura (cm) 50,3 (49,6-50,9) Vs 49,7 (48,9-50,4). Respecto al Apgar: a 1 min fue de 9,1 (8,8-9,3) Vs 8,9 (8,7-9,2), a 5 minutos fue de 9,7 (9,5-9,9) Vs 9,8 (9,07-9,09), a 10 minutos fue de 9,9 (9,8-10) Vs 9,9 (9,7-10). Hubo malformaciones menores en 1 recién nacido en el grupo TL (0,6%). Sin embargo, no se encontraron malformaciones mayores o mortalidad perinatal en ninguno de los dos grupos.

CONCLUSIONES:

De este estudio aleatorizado se concluye, que la utilización de incubadores de TL no conlleva a efectos perjudiciales o incremento en ellos, en los resultados obstétricos y perinatales en comparación con los IC. Por tanto se puede deducir que además de otras ventajas que nos brinda esta tecnología, es una alternativa eficaz y segura para la incubación de embriones y futuros recién nacidos; sin embargo, se requerirán más estudios (aleatorizados o no), con un mayor número de pacientes que consoliden estos resultados.

CO-007: VALORES DE REFERENCIA PARA LOS PARÁMETROS MORFOCINÉTICOS EMBRIONARIOS.

M. Canales Gijón (1), A. Clavero Gilabert (1), MC. Gonzalvo López (1), MJ .Hernández Hernández (2), AR. Díaz Corujo (3), B. Migueles Pastor (4), I. Durán Salas (5), M. Rodríguez Palomino (6), A. Garrido Torrecillas (7), B. González López de Bustamante (8)

(1) Unidad de Reproducción UGC Laboratorio Clínico y UGC Obstetricia y Ginecología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Instituto de Investigación Biosanitario de Granada (IIBG), Granada, España., (2) Centro de Asistencia a la Reproducción Humana de Canarias, Tenerife, España., (3) Ginefiv, Madrid, España., (4) Ginemed, Sevilla, España., (5) Hospital Virgen del Mar, Almería, España., (6) Roquetas F.I.V., Almería, España., (7) Clínica Medrano, Algeciras, Cádiz, España., (8) Hospital Vithas Ntra. Sra. de Fátima, Vigo, España.

mkg.3@hotmail.com

INTRODUCCIÓN:

El intervalo de referencia de una variable se define por un par de valores de dicha variable entre los cuales se encuentra el 95% de los valores de dicha variable en una población de referencia. Muchos de los intervalos publicados hasta la fecha para parámetros morfocinéticos solo incluyen al 50% de los embriones implantados, pues se han definido utilizando los percentiles 25 y 75. Esto hace que muchos embriones que implantarían sean descartados (baja especificidad), por lo que es necesario establecer estos intervalos de referencia para dichos parámetros morfocinéticos siguiendo recomendaciones estandarizadas.

OBJETIVOS:

Definir los valores de referencia de parámetros de morfocinética de embriones humanos implantados en ciclos de ICSI.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se siguieron las recomendaciones de la Sociedad Española de Química Clínica para la definición de valores de referencia. Se analizaron los datos

de 131 embriones con implantación conocida cultivados en 15 centros diferentes mediante el sistema de morfocinética Primo-Vision. Todos los embriones fueron cultivados en medios Vitrolife en una atmósfera 5% CO₂ y transferidos en D+2 o D+3. Se incluyeron embriones procedentes de mujeres entre 22 y 38 años y que habían sido estimuladas para ICSI con protocolo análogo largo o antagonistas; y el disparo de la ovulación con análogo o hCG. Se excluyeron mujeres con cirugía uterina previa. Se consideró t"0" el tiempo de microinyección del primer ovocito. La normalidad de las variables cuantitativas se determinó por el test de Shapiro-Wilk, rechazándose la hipótesis de normalidad por debajo de un p<0,001. El cálculo de los intervalos de referencia de las variables de morfocinética que siguieron una distribución normal se calculó mediante la fórmula "media±1,96*desviación típica". Y para las variables que no siguieron una distribución normal se calculó el percentil 2,5 y 97,5.

RESULTADOS:

Los valores de referencia obtenidos para embriones implantados, expresados en horas, fueron: extrusión 2° CP= 1,0-5,6;

aparición de pronúcleos = 3,7 - 14,2; desaparición de pronúcleos = 9,2 - 28,8; inicio t₂= 20,2 - 30,2; t₂ = 21,0-31,4; t₃= 28,5 - 44,1; t₄= 31,5 - 45,0; t₅=39,4 - 60,7; t₆= 43,5- 61,1; t₇= 45,1 - 64,7; t₈= 44,6 - 69,9.

También se calcularon los valores de referencia para parámetros morfocinéticos indirectos como: duración de PN= 6,5 - 20,6; ciclos celulares (CC1=18,2 - 28,3; CC2=4,4 - 16,5; CC3= 6,5 - 21,6) y ciclos de división embrionaria (1° citoquinesis = 0,05 - 1,8; 2° ciclo división embrionaria = 7,7 - 18,6; 3° ciclo división embrionaria= 6,5 - 21,6).

CONCLUSIONES:

Se han establecido valores de referencia multicéntricos para los parámetros morfocinéticos embrionarios que permitirán mejorar la utilidad clínica de los sistemas de morfocinética. Los límites de estos valores de referencia ayudarán a una mejor definición de variables embrionarias utilizadas en la clasificación de ASEBIR.

CO-008: ESTUDIO MULTICENTRICO PROSPECTIVO SOBRE MORFOCINÉTICA EMBRIONARIA, CLASIFICACIÓN DE ASEBIR E IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA.

M. Rodríguez Palomino (1), M. Canales Gijón (2), AB. Rogido Sánchez (3), E. Martín Díaz (4), I. Landaburu Marí (5), A. Fernández Martín (6), I. Suárez Vergara (7), M. Salas Martínez (8), E. Olaya Vila (9), A. González Utor (10), JA. Castilla Alcalá (2) (1) Roquetas F.I.V., Almería, España., (2) Unidad de Reproducción UGC Laboratorio Clínico y UGC Obstetricia y Ginecología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Instituto de Investigación Biosanitario de Granada (IIBG), Granada, España., (3) IMARA, Barcelona, España., (4) Unidad de Reproducción. Hospital Quirón, Málaga, España., (5) Instituto de Fertilidad, Palma de Mallorca, España., (6) UHRA Nisa-Ginemed, Valencia, España., (7) Unidad de Reproducción de Clínica Sanabria, Granada, España., (8) Roquetas F.I.V., Almería, España., (9) Clínica Tambre, Madrid, España., (10) MasVida Reproducción, Sevilla, España.
marinarodriguezpalomino@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

Los estudios que han intentado relacionar los parámetros morfocinéticos con la tasa de implantación han obtenido resultados contradictorios. No existiendo actualmente consenso sobre que parámetro morfocinético es el que predice mejor la implantación embrionaria. Una estrategia para aumentar el rendimiento de los sistemas de morfocinética es incorporar las variables morfocinéticas a los modelos predictivos basados en morfocinética en los parámetros morfológicos embrionarios clásicos (clasificación de ASEBIR), usados ampliamente antes de la llegada de las plataformas de morfocinética.

OBJETIVOS:

Determinar qué parámetros morfocinéticos embrionarios mejoran la capacidad predictiva de implantación embrionaria de la clasificación de ASEBIR.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se diseñó un estudio multicéntrico prospectivo con la participación de 15 centros. Se analizaron 347 ciclos de ICSI con transferencias embrionarias en D+3, en los que se obtuvo 131

embriones con implantación, 313 sin implantación y 56 sin implantación conocida. Los embriones fueron cultivados en la plataforma de morfocinética Primo?Vision. Todos los embriones fueron clasificados según la clasificación de ASEBIR. Factores de confusión como causa de la esterilidad, edad, años de esterilidad, origen de los ovocitos, estimulación de la ovulación, centro y protocolo de laboratorio fueron controlados. Se realizó una comparación univariante de todas las variables analizadas entre embriones con y sin implantación. Las variables en las que se obtuvo una $p < 0,20$ en este análisis fueron consideradas candidatas en un modelo de Regresión Logística para la implantación embrionaria. Se calcularon curvas ROC de las variables incluidas en dicho modelo y se utilizó el coeficiente R^2 de Nagelkerke corregido para comparar los modelos de Regresión logística obtenidos.

RESULTADOS:

En el análisis univariante, las siguientes variables presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre embriones con y sin implantación: categoría de ASEBIR, desaparición de pronúcleos, t2-tiempo aparición pronúcleos (cc1), t5-t4 y años de esterilidad. Las únicas variables incluidas en el

modelo de regresión logística fueron la clasificación de ASEBIR y la desaparición de pronúcleos. La tasa de implantación en las distintas categorías de ASEBIR fue: A = 48,2%; B=26,5%; C=20,4%; D=6,0%; y el tiempo de desaparición de PN fue A=22,8±2,8; B=24,0±5,1; C=24,3±6,3 y D=25,8±5,0. El coeficiente R^2 de Nagelkerke corregido demostró que ambas variables formaban un modelo con mayor capacidad pronóstica de implantación (0,227) que los modelos con las variables consideradas individualmente: clasificación de ASEBIR (0,172) o tiempo desaparición de pronúcleos (0,071). El área bajo la curva obtenida para implantación embrionaria fue similar para la variable tiempo de desaparición de pronúcleos (0,619 [0,555-0,683]) que para la clasificación de ASEBIR (0,701 [0,642-0,760]).

CONCLUSIONES:

El uso conjunto de parámetros morfocinéticos tempranos (tiempo de desaparición de pronúcleos) y la clasificación de ASEBIR mejora la capacidad pronóstica de esta última de la implantación embrionaria. Este estudio multicéntrico pone de relieve que marcadores morfocinéticos de D+2 o D+3 no aportan información significativa a la clasificación de ASEBIR.

CO-009: LA RELACIÓN DE LA CLASIFICACIÓN EMBRIONARIA, OBTENIDA A TRAVÉS DE UN SISTEMA AUTOMÁTICO BASADO EN MORFOCINÉTICA, CON EL POTENCIAL DE IMPLANTACIÓN ES INDEPENDIENTE DE LA MORFOLOGÍA EMBRIONARIA, DE LA CALIDAD OVOCITARIA Y DEL DÍA DE TRANSFERENCIA.

S. Pérez Albalá, B. Aparicio Ruiz, L. Romany Sevilla, T. Vitoria Samonchin, MJ. De los Santos Molina, M. Meseguer Escrivá
IVI VALENCIA, Valencia
sonia.perez@ivi.es

INTRODUCCIÓN:

La valoración morfológica de los embriones junto con una valoración automatizada de la cinética de las divisiones embrionarias puede suponer una nueva herramienta de clasificación embrionaria que puede aumentar las probabilidades de gestación.

OBJETIVOS:

Cuantificar, mediante un modelo multivariable, la relación de las diferentes categorías proporcionadas por el sistema automatizado Eeva con la tasa de implantación, con el propósito de validar el algoritmo del Eeva en diferentes situaciones clínicas.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo en el que se incluyeron un total de 3602 embriones procedentes de 494 ciclos de fecundación in vitro. Todas las determinaciones se realizaron en el interior de un incubador convencional con una cámara incorporada diseñada para la captura y análisis de imagen de forma automática: EEVA (EarlyEmbryoViabilityAssessment). Este sistema clasifica los embriones usando el algoritmo propuesto por Wong (Wong et al., 2010), en el cual los rangos óptimos para P2 (t3-t2) y P3 (t4-t3) categorizan los embriones según su probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto en HIGH, MEDIUM y LOW. Teniendo en cuenta los criterios

morfológicos (ASEBIR) y la clasificación Eeva, 829 embriones fueron seleccionados para transferencia. Para cuantificar el potencial de implantación según el algoritmo del Eeva, se realizó un análisis de regresión logística sólo en los embriones de implantación conocida (número de sacos gestacionales igual que número de embriones transferidos (KID n=491), considerando como factores de confusión o sesgo: origen ovocitario (ovocitos propios o donados), día de transferencia (D3/D5), número de ovocitos obtenidos y clasificación morfológica embrionaria según ASEBIR (A, B, C, D).

RESULTADOS:

Según la categorización del Eeva: 162 (33%) embriones fueron clasificados como HIGH, 124 (25%) MEDIUM y 205 (42%) LOW. La odds ratio (OR) para la implantación fue expresada en términos de intervalo de confianza 95% (95% CI) y significancia. Al comparar las tasas de implantación de las tres categorías no encontramos diferencias significativas cuando comparamos LOW contra MEDIUM (p= 0,68, OR=1,54 CI95% 0,968-2,448). Sin embargo, cuando comparamos embriones HIGH contra LOW sí que encontramos diferencias en la tasa de implantación (p= 0.003, OR=1.90 CI95% 1.239-2.912). Además, se realizó otro análisis adicional incluyendo los posibles factores de confusión descritos anteriormente: tipo de ciclo, día de transferencia, número de ovocitos obtenidos y clasificación

morfológica según ASEBIR. En este análisis también encontramos diferencias significativas y comparables entre las tasas de implantación de embriones HIGH y LOW (p=0.019, OR=1.72 CI95% 1.10-2.70).

CONCLUSIONES:

Este trabajo muestra los resultados obtenidos con el mayor número de embriones seleccionados, hasta la fecha, mediante tecnología time-lapse utilizando el sistema automatizado Eeva. La relación observada con el potencial de implantación refleja una relación directa entre los parámetros proporcionados por el sistema automático y la calidad embrionaria y puede ser utilizado para la selección embrionaria en el trabajo diario. Además, nuestro análisis multivariable demuestra que la relación entre Eeva y potencial de implantación es robusta e independiente de otras variables clínicas tales como calidad ovocitaria, día de la transferencia o la morfología embrionaria.

BIBLIOGRAFÍA:

-Connie C Wong, Kevin E Loewke, Nancy L Bossert, Barry Behr, Christopher J De Jonge, Thomas M Baer & Renee A Reijo Pera. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nature biotechnology*. Vol 28, num 10. 2010.

CO-010: RESULTADO DEL ENSAYO PILOTO DE UN PROGRAMA DE CONTROL DE CALIDAD EXTERNO DE MORFOCINÉTICA EMBRIONARIA.

L Martínez Granados (1), A González Utor (2), M Serrano Molina (3), V Badajoz Liébana (4), N Prados Dodd (5), E Olaya Vila (6), A Farreras Ayestaran (7), S Zamora López (8), M López Regalado (1), N Ortiz Piñate (9), JA. Castilla Alcalá (1)

(1) Unidad de Reproducción UGC Laboratorio Clínico y UGC Obstetricia y Ginecología. Complejo Hospitalario Universitario de Granada. Instituto de Investigación Biosanitario de Granada (IIBG), Granada, España., (2) MasVida Reproducción, Grupo de Interés de Calidad de ASEBIR, Sevilla, España., (3) Clínica IFEM, Córdoba, España., (4) Ginefiv, Madrid, España., (5) IVI, Sevilla, España., (6) Clínica Tambre, Madrid, España., (7) Institut Marqués, Barcelona, España., (8) CEIFER, Granada, España., (9) Instituto Europeo de Fertilidad, Grupo de Interés de Calidad de ASEBIR, Madrid, España.

luismargra@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

Las diferentes plataformas de morfocinética se han instalado en nuestros laboratorios sin análisis previos de su variabilidad entre centros. Su uso exige a los centros usuarios la determinación del tiempo exacto en que se produce cada evento del desarrollo embrionario. Aunque actualmente se ha comprobado una baja variabilidad entre observadores del mismo centro, se desconoce si existen variaciones entre centros a la hora de establecer estos tiempos. Para estudiar esta variabilidad es necesario el desarrollo de programas de control calidad externo.

OBJETIVOS:

Desarrollar un programa de control de calidad externo de morfocinética embrionaria.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Los centros participantes lo hicieron de forma voluntaria tras aceptar la invitación que ASEBIR hizo a todos sus asociados, siendo condición indispensable disponer de alguna de las dos plataformas evaluadas (Embryoscope (E) o Primo Vision

(PV)). A cada centro participante se le envió tres proyectos, incluyendo cada proyecto imágenes del desarrollo de entre 9-14 ovocitos hasta el estadio de blastocisto. Al mismo tiempo se facilitó unas instrucciones con explicaciones sobre el funcionamiento del programa de control calidad y una base de datos para la recogida de tiempos y otras características morfológicas (anomalías ovocitarias, número pronúcleos, fragmentación, vacuolas, asimetría, compactación). Se calculó para cada tiempo analizado el coeficiente de variación y el índice de correlación intraclase. Para las características morfológicas valoradas cualitativamente se utilizó el índice kappa ponderado de Fleiss.

RESULTADOS:

En total participaron 16 centros con Primo Vision y 9 con Embryoscope. Los CV obtenidos oscilaron desde un 1.75% para el inicio de t2 hasta un 33.13% para el tiempo de extrusión del segundo corpúsculo polar, siendo iguales entre Embryoscope y Primo Vision. Los Coeficientes de correlación intraclase fueron en todos los tiempos y en ambas plataformas superiores a 0.77. Sin embargo, los índices de concordancia

Kappa Fleiss para variables cualitativas fueron muy buenos para número de pronúcleos (PV: 0,92; E: 0,91); bueno para fragmentación (PV: 0,65; E: 0,55) y compactación (PV: 0,52; E: 0,79); moderados para vacuolas (PV: 0,39; E: 0,51); bajo para asimetría (PV: 0,38; E: 0,38) y fueron insignificantes para anomalías ovocitarias (PV: 0,12; E: 0,11). No existieron diferencias significativas en ningún coeficiente Kappa de Fleiss entre los laboratorios que utilizaron Embryoscope y Primo Vision.

CONCLUSIONES:

Las dos plataformas evaluadas han presentado una variabilidad entre centros óptima para la determinación de tiempos de los diferentes eventos morfocinéticos embrionarios. Sin embargo, estas plataformas presentan una alta variabilidad entre centros cuando se valoran otras características morfológicas distintas de tiempos. Es necesario unificar criterios para la valoración de la morfología embrionaria mediante plataformas de morfocinética, al igual que se ha realizado para la evaluación embrionaria clásica o estática.

CO-011: INDICADORES MORFOCINÉTICOS PARA LA SELECCIÓN EMBRIONARIA EN D+3

B. Carrasco Canal, G. Arroyo Cardona, Y. Gil Saumell, M.J. Gómez Cuesta, I. Rodríguez García, P.N. Barri Rague, A. Veiga Lluch, M. Boada Pala
 Departamento de Obstetricia, Ginecología y Reproducción. Hospital Universitario Quirón Dexeus, Barcelona
beacar@dexeus.com

INTRODUCCIÓN:

El cultivo de embriones con tecnología Time Lapse nos aporta información constante del estado morfológico de los embriones y su morfocinética y nos permite optimizar la selección embrionaria, evitando además los efectos negativos provocados por las fluctuaciones de temperatura experimentadas al realizar las observaciones diarias al microscopio invertido.

OBJETIVOS:

Determinar los parámetros morfocinéticos embrionarios que nos ayuden a la selección de los embriones a transferir y que puedan constituir un indicador de implantación propio de nuestro laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Análisis retrospectivo de 716 embriones cultivados con medios de cultivo Vitrolife® serie V y en un incubador Embryoscope™: 114 embriones que implantaron y 602 que no implantaron. Los embriones procedían de 399 ciclos de ICSI con ovocitos propios, muestras de semen de eyaculado fresco y transferencia embrionaria en D+3 realizados durante el periodo del 01/07/2011 al 30/06/2013. La selección de embriones a transferir se basó exclusivamente en parámetros morfológicos.

Se tomaron imágenes de cada embrión en 5 planos focales cada 15 minutos. Se compararon las medianas de los tiempos (horas) de formación y desaparición de los pronúcleos, división a 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 células (t₂, t₃, t₄, t₅, t₆, t₇ y t₈), sincronía (s₂= t₄ - t₃; s₃= t₈ - t₅)

y duración del segundo y tercer ciclo celular (cc₂= t₃ - t₂; cc₃= t₅ - t₃), se analizaron los rangos de tiempo con mayor tasa de implantación para cada uno de los parámetros analizados y se desarrolló un algoritmo para la selección embrionaria mediante la aplicación de un árbol de decisión.

La comparación entre los tiempos medianos de división se realizó mediante la prueba de Mann-Whitney.

RESULTADOS:

- La mediana de los tiempos de división entre los dos grupos (implantan vs no implantan) no difirió significativamente excepto para los valores indicativos de la sincronía celular, s₂ (0.75 vs 1) y s₃ (3.88 vs 5.67).

- El análisis de los tiempos de división celular agrupados en cuatro rangos de tiempo, mostró diferencias significativas en las tasas de implantación (IR) para t₄, t₈ además de para s₂ y s₃.

t₄ <37.27h (IR 17.8%); t₄= 37.28h - 39.75h (IR 17.9%) y t₄= 39.76h - 43.10h (IR 20.5%) en relación a t₄ >43.11h (IR 11.7%).

t₈ <52.64h (IR 18.6%); t₈= 52.64h - 56.52h (IR 18.8%) y t₈= 56.53h - 62.07h (IR 18.8%) en relación a t₈ >62.08h (IR 10.6%).

s₂ <0.67h (IR 21.5%); s₂= 0.68h - 1h (IR 20.2%) y s₂= 1.01h - 2.25h (IR 18.3%) en relación a s₂ >2.26h (IR 9.4%).

s₃ <3h (IR 24.4%) en relación a s₃= 3.01h - 5.5h (IR 17.2%), s₃= 5.51h - 11.25h (IR 16.3%) y a s₃ >11.26h (IR 9.3%).

- Estos resultados permitieron desarrollar un algoritmo para la selección embrionaria en el que los embriones con morfología óptima en D+3, t₄ <43h y s₃ <3h, obtenían las mayores tasas de implantación (IR 33%).

CONCLUSIONES:

- En el algoritmo desarrollado a partir de este estudio, la selección de los embriones con mayor potencial de implantación se obtiene al combinar la morfología clásica con la morfocinética.

- Los parámetros morfocinéticos relevantes para predecir la implantación fueron los relacionados con la sincronía de los primeros ciclos celulares (s₂ y s₃) y los tiempos de división t₄ y t₈.

- La aplicación de parámetros morfocinéticos en la práctica asistencial debe realizarse de acuerdo a los parámetros propios de cada centro ya que las características intrínsecas de cada laboratorio pueden variar los tiempos de división.

- La tecnología Time Lapse puede ser una herramienta útil en los laboratorios de TRA para aumentar las tasas de implantación.

BIBLIOGRAFÍA:

- Prediction of embryonic developmental competence by time-lapse observation and shortest-half analysis. Arav et al 2008.
- The Use of morphokinetic as a predictor of embryo implantation. Meseguer et al 2011.
- The use of morphokinetic parameters to select all embryos with full capacity to implant. Chamayou et al 2013.

CO-012: PREDICCIÓN DE TASA DE BLASTOCISTO, EUPLOIDIA E IMPLANTACIÓN MEDIANTE PARÁMETROS MORFOCINÉTICOS TEMPRANOS

E. Rocafort Curià (1), A. Leza (1), M. Guijarro (1), LL. Medrano (1), B. Ramos (1), L. García (1), I. Vilella (1), M. Velasco (2), Y. Franco (2), M. Fernández (1)

(1) IVF SPAIN, Alicante (2) IVF DONOSTI, San Sebastián
eugeniarocafort@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

Con la introducción de los sistemas time-lapse en la rutina diaria de laboratorio, muchos grupos han estudiado distintos parámetros morfocinéticos para la mejora de la selección embrionaria. Sin embargo, hay discordancia en cuanto a la relación de los parámetros morfocinéticos con la formación de blastocisto, probabilidad de euploidía y mejora de la implantación. Recientemente, ha aparecido un sistema de time-lapse automático que clasifica los embriones en 3 categorías dependiendo de los rangos de división de 2 parámetros: P2 (tiempo de división de 2 a 3 células) y P3 (tiempo de 3 a 4 células).

OBJETIVOS:

Determinar si los parámetros morfocinéticos tempranos, tales como P2 y P3, están correlacionados con la formación de blastocisto, euploidía e implantación.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo (Sept 2013-Abril 2015). Un total de 76 pacientes fueron incluidos en nuestro programa de Screening de Aneuploidías (PGS). 740 embriones fueron cultivados en el sistema Eeva?. Se trata de un sistema automatizado de time-lapse,

que proporciona en Día 3 de cultivo una predicción (High/Medium/Low) dependiendo de los tiempos P2 y P3. Además los embriones con implantación conocida (KID) fueron estudiados dependiendo de la categorización del sistema. Todos los embriones fueron cultivados y biopsiados en Día 5-6 de desarrollo embrionario y fueron analizados mediante secuenciación masiva (NGS). Todas las transferencias embrionarias fueron en diferido y bajo tratamiento hormonal sustitutivo. La selección embrionaria para la transferencia fue basada en los resultados del PGS y del criterio morfológico. Se consideró implantación la confirmación de saco en la semana 6-7 de gestación.

RESULTADOS:

De 740 embriones, 29.8% tuvieron predicción High, 20.5% Medium y un 49.7% Low. La tasa de formación de blastocisto para High, Medium y Low fue del 80.9% (178/220), 72.4% (110/152) y 40.2% (148/368), respectivamente, siendo estadísticamente significativa High y Medium con respecto al Low ($p < 0.0001$). La tasas de euploidia para cada categoría fueron 35.5% (78/220) en embriones High, 31.6% (48/152) en Medium y 18.5% (68/368) en Low con diferencias significativas del High y Medium respecto al Low ($p < 0.0001$). Sin embargo, no se encontraron

diferencias significativas en tasa de blastocisto euploide siendo del 43.8% (78/178) en los High, 43.6% en los Medium (48/110) y 45.9% en los Low (68/148). De un total de 62 embriones euploides con implantación conocida, la tasa de implantación para los High fue del 52.6% (20/38), del 33.3% (3/9) para los Medium y del 13.3% (2/15) en los Low. Estos resultados fueron estadísticamente significativos al comparar los KID High respecto de los Low ($p = 0.009$).

CONCLUSIONES:

De acuerdo con nuestros resultados, los parámetros morfocinéticos P2 y P3 están correlacionados con la formación de blastocisto, la euploidia y la tasa de implantación. Sin embargo, estos parámetros no son útiles como predicción de euploidia cuando se combina con el cultivo largo a blastocisto. Un sistema automatizado de time-lapse puede ser útil en combinación con el PGS para seleccionar el blastocisto con mayor potencial de implantación dentro de una cohorte de embriones euploides. Estos resultados pueden indicar que el potencial de implantación no solo depende de la ploidía del embrión para obtener un embarazo con éxito y que la cinética embrionaria puede estar relacionada con otros parámetros de calidad.

CO-013: EL ESTUDIO MORFOCINÉTICO DE LOS PREEMBRIONES TRIPRONUCELARES DE ICSI PERMITE PREDECIR SU CORRECCIÓN HACIA LA DIPLOIDÍA

C. Albert Rodríguez, Y. Galiana Briones, L. Escrich Albelda, N. Grau Grau, P. Gámiz Izquierdo, MJ. Escribá Pérez
IVI Valencia, Valencia
carmela.albert@ivi.es

INTRODUCCIÓN:

Estudios previos han demostrado que los embriones tripnucleares (TPN), emergentes tras la aplicación de la ICSI (TPN-ICSI), no constituyen una población homogénea; autocorrigiéndose hacia la diploidía la mitad de los TPN, mientras que el resto permanece triploide.

OBJETIVOS:

Describir y comparar la morfocinética de los TPN-ICSI en función de su ploidía y, estudiar el valor predictivo de la diploidía según las variables morfocinéticas.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Diseño experimental realizado sobre TPN-ICSI, de ciclos de DPI y cultivados en sistema time-lapse, desde su identificación en el momento de la fecundación hasta el estadio de blastocisto. En 23 TPN se determinó la ploidía por FISH (5 cromosomas), realizando la biopsia embrionaria en estadio de células y/o blastocisto. Retrospectivamente, se comparó la morfocinética de los TPN-ICSI en función de su ploidía (diploide vs triploide) y también con 17 embriones bipnucleares (BPN; control) que resultaron, tras su transferencia

intraútero en día 3 de desarrollo en nacidos vivos sanos. Tras el escrutinio de las filmaciones embrionarias, se obtuvieron los tiempos de división desde el estadio de 2 a 8 células (variables directas) y, se determinó la duración del segundo (cc2) y tercer (cc3) ciclo celular (variables indirectas). El escrutinio de las filmaciones permitió definir los patrones de división embrionaria en los BPN, TPN diploides y triploides.

A fin de determinar el valor predictivo de las variables morfocinéticas en relación a la ploidía de los TPN, desarrollamos un análisis de egresión logística binomial, empleando un método forward step.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS17.0.

RESULTADOS:

Los TPN triploides se dividen significativamente más tarde que los diploides a partir de la tercera división (t4; Tabla). Los TPN diploides mostraron un comportamiento morfocinético comparable a los BPN; no así los TPN triploides (Tabla). Respecto a los patrones de división, un porcentaje significativamente mayor de los TPN diploides (41.8%) presentaron un patrón de división alterado cuando se comparó con los BPN (0%) y TPN triploides (5.9%). Los patrones de

división alterados se basan en: (i) una división blastomérica que resulta en tres células en lugar de las esperadas dos o (ii) una duración de ciclo celular anómalamente breve.

CONCLUSIONES:

Los TPN no son homogéneos en términos de ploidía, morfocinética ni patrón de división. Los TPN autocorregidos a diploides, pero no los triploides, son morfocinéticamente similares a los BPN. La mayor frecuencia de TPN diploides con un patrón de división alterado nos hace sospechar de su posible implicación como mecanismo de corrección hacia la diploidía. La variable t5, permitiría predecir la diploidía en TPN-ICSI; es decir, su capacidad de autocorrección.

BIBLIOGRAFÍA:

Rosenbusch BE. Mechanisms giving rise to triploid zygotes during assisted reproduction. *Fertil Steril* 2008;90:49-55.

Rubio I, Galán A, Larreategui Z, Ayerdi F, Bellver J, Herrero J, et al. Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope. *Fertil Steril* 2014;102:1287,1294. e5.

CO-014: IMPACTO DE UN SISTEMA AUTOMATIZADO DE TIME-LAPSE EN UN PROGRAMA DE OVODONACIÓN TRANSFIRIENDO EN ESTADIO DE BLASTOCISTO

E. Rocafort Curià (1), M. Velasco (2), A. Leza (1), M. Guijarro (1), L. Medrano (1), B. Ramos (1), L. Garcia (1), I. Vilella (1), Y. Franco (2), M. Fernández (1)

(1) IVF SPAIN, Alicante. (2) IVF DONOSTI, San Sebastián

eugeniarocafort@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

La introducción en los laboratorios de reproducción asistida de los sistemas time-lapse permiten mejorar las condiciones de cultivo y ayudan en la desección embrionaria. Sin embargo, no está claro si los parámetros morfocinéticos pueden mejorar los resultados clínicos. Estudios previos han demostrado que el análisis mediante time-lapse puede ayudar a los embriólogos a identificar los embriones con un mayor potencial de implantación. Se han propuesto muchos algoritmos morfocinéticos en los últimos años, siendo P2 (tiempo de división de 2 a 3 células) y P3 (tiempo de división de 3 a 4 células) los parámetros más comunes en todos ellos.

OBJETIVOS:

Evaluación, mediante tasa de blastocisto, embarazo e implantación, del algoritmo de un sistema de time-lapse automático como técnica de selección embrionaria en un programa de donación de óvulos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo y multicéntrico (Oct.2013 - Abr.15). Un total de 280

pacientes del programa de ovodonación de dos centros consintieron cultivar sus embriones en el sistema Eeva™, un test automático basado en parámetros morfocinéticos tempranos: P2 y P3. Dependiendo de estos tiempos, Eeva clasifica los embriones en 3 categorías: High, Medium y Low (probabilidad de formación de blastocisto). 2832 cigotos fueron cultivados en Eeva™ hasta día 5. Los criterios de selección embrionaria se basaron en morfología y predicción más alta de Eeva™. Todas las transferencias embrionarias fueron realizadas en ciclos frescos con protocolo sustituido como preparación endometrial.

RESULTADOS:

La tasa de blastocisto dependiendo de la categoría del Eeva™ fue 83% (656/790) en High, 72.6% (514/708) en Medium y de 36,1% (482/1332) en Low, siendo estadísticamente significativa entre las tres categorías ($p < 0.0001$). Analizando las tasas de embarazo cuando solo se transfirieron embriones de la misma categoría fueron: del 68.3% (86/126) cuando solo se transfirieron High, del 67.4% (31/46) cuando solo se transfirieron Medium y del 58.8% (10/17) con solo Low, observando una tendencia sin significación estadística.

Sin embargo, se estudiaron un total de 308 embriones con implantación conocida, siendo la tasa de implantación para cada categoría de 56.5% (100/177) en High, del 43.8% (39/89) en Medium y del 42.9% (18/42) en Low, siendo estadísticamente significativa entre High y Medium ($p < 0.05$).

CONCLUSIONES:

Los parámetros morfocinéticos tempranos P2 y P3 están altamente correlacionados con la probabilidad de formación de blastocisto, por lo que son marcadores muy útiles cuando se transfiere en día 3. Además, se observa un incremento del 10% en cuanto a tasa de embarazo de la categoría High respecto a Low y asciende a un 14% cuando se compara con tasa de implantación. Sin embargo, no hay significación estadística posiblemente debido al bajo número de casos en el grupo Low. Por otro lado, el incremento observado en tasa de implantación indica que las categorías basadas en los parámetros P2 y P3 son útiles en identificar los embriones con mayor potencial entre la misma cohorte de blastocistos, siendo los High los de mejor pronóstico.

CO-015: LOS TRANSCRITOS NO CODIFICANTES DE LOS OVOCITOS HUMANOS SE VEN AFECTADOS POR LA EDAD Y LA RESERVA OVÁRICA DE LA MUJER

M. Barragán(1), IJ. Pons(2), A. Ferrer(1), A. Schweitzer(3), J. Hubbard(3), H. Auer(4), A. Rodolosse(4), R. Vassena(1)

(1)Clínica EUGIN, Barcelona, (2)Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), (3)Affymetrix, (4)Functional GenOmic Consulting. rvassena@eugin.es

INTRODUCCIÓN:

Tanto la edad de la mujer como su reserva ovárica afectan a la competencia al desarrollo del ovocito. Sin embargo, la importancia relativa de estos dos factores es difícil de discernir puesto que el envejecimiento está ligado a un descenso en la reserva ovárica de la mujer. Los ovocitos almacenan grandes cantidades de RNA en su citoplasma, entre ellos transcritos no codificantes (ncRNAs) involucrados en el control de los mecanismos de transcripción y traducción que se producen durante el desarrollo temprano. Hasta el momento, no se ha caracterizado el perfil de ncRNA en ovocitos humanos, a pesar de que tengan un papel central en las primeras fases del desarrollo tras la fecundación, así como en la transición materno-zigótica.

OBJETIVOS:

El principal objetivo del presente estudio es identificar marcadores moleculares candidatos para determinar la competencia del ovocito durante el desarrollo, teniendo en cuenta tanto la edad reproductiva de la mujer como sus niveles de reserva ovárica. Además, se pretende analizar la relevancia de la edad y de la reserva ovárica, de manera independiente, en los posibles cambios

que se observan en el perfil de ncRNA.

MATERIAL Y MÉTODOS:

El estudio incluye 36 ovocitos MII de 30 donantes. El rango de edad de las donantes es 20-35 años, y el recuento de folículos antrales (FA) entre 5 y 33. Se definen 4 grupos experimentales, incluyendo cada uno de ellos 9 MII independientes: A) ≥ 22 años y > 20 FA; B) ≥ 33 años y > 20 FA; C) ≥ 22 años y < 10 FA; D) ≥ 33 años y < 10 FA. El RNA total de cada MII se ha purificado de manera individual y se prepararon librerías de cDNA (WTA2); se fragmentaron y biotinizaron 10 μ g del cDNA que fueron hibridados en 36 arrays GeneChip® Human Transcriptome Array 2.0. Para identificar transcritos expresados diferencialmente, se utilizó el Affymetrix® Transcriptome Analysis Console, seleccionando una expresión diferencial de los genes en los grupos > 1.5 o < -1.5 ($p < 0.05$).

RESULTADOS:

Los perfiles transcripcionales globales de las muestras se agrupan en clusters según los grupos de estudio. Del análisis comparativo de los 286,263 transcritos presentes en el array, se encontraron 82 ncRNA diferencialmente expresados al comparar los grupos por edad,

independientemente de la reserva ovárica. Entre ellos, se identificaron 2 miRNA (mir4262 y mir1260a) que tienen como dianas a FIGN y AGO1, genes involucrados en el desarrollo embrionario. Al comparar los grupos teniendo en cuenta la reserva ovárica independientemente de la edad, se identificaron 58 ncRNA. Entre éstos, 4 piRNAs implicados en el control de la programación epigenética y de la regulación postranscripcional en la línea germinal. Cabe destacar que sólo 3 ncRNA se vieron afectados comparando todos los grupos teniendo en cuenta la edad y la reserva ovárica. RNY5, uno de ellos, es un miembro de la familia Y RNA, RNAs no codificante requeridos para la correcta replicación del DNA.

CONCLUSIONES:

Este estudio describe por primera vez el perfil de ncRNA de los ovocitos humanos MII, aportando luz al efecto de la edad y de la reserva ovárica en la transcriptómica de ncRNA, y encadenando el efecto de ambas variables a la regulación transcripcional y traduccional de los primeros momentos de la embriogénesis humana. Además, se identifican por primera vez potenciales ncRNA marcadores de calidad ovocitaria como mir4262, mir1260a y RNY5.

CO-016: ALTERACIONES DE LA EXPRESIÓN DE DNA METILTRANSFERASAS Y DE GENES IMPRINTADOS EN OVOCITOS MII TRAS VITRIFICACIÓN/DESVITRIFICACIÓN

M. Barragán, A. Pujol, A. Obradors, V. Vermaeve, R. Vassena
Clínica EUGIN, Barcelona
rvassena@eugin.es

INTRODUCCIÓN:

Las modificaciones epigenéticas, como la metilación del DNA, son mecanismos evolutivamente conservados y tienen un papel relevante en el desarrollo embrionario, puesto que participan en el control de la expresión génica. La impronta genética o imprinting se produce por la metilación de ciertos genes en uno de los alelos de forma que, dependiendo del sexo del progenitor, son expresados de un modo específico y monoalélico. El establecimiento y el mantenimiento de la impronta genética se produce durante la gametogénesis y se alarga hasta los primeros estadios del desarrollo embrionario, justo los momentos en los que actúan las TRA. Los datos obtenidos en modelos animales indican que la pérdida de la impronta genética y/o de la metilación del DNA se encuentra asociada a las técnicas de TRA. Sin embargo, los estudios realizados en humanos se suelen encontrar afectados por el hecho que los ovocitos disponibles para investigación provienen de pacientes con diferentes grados de infertilidad, haciéndose complicado separar las alteraciones de las marcas epigenéticas causadas por las técnicas de TRA de las causadas por la predisposición genética y/o ambiental de los pacientes.

OBJETIVOS:

El objetivo del presente estudio es investigar el efecto de la vitrificación/

desvitrificación de los ovocitos MII humanos sobre la expresión de genes imprintados, así como de genes involucrados en los mecanismos de establecimiento y mantenimiento de la impronta genética.

MATERIAL Y MÉTODOS:

El estudio incluye 42 ovocitos maduros (MII) obtenidos de 26 donantes fértiles, de 28.6 ± 4.76 años de edad. En todos los casos se aplicó el mismo protocolo de estimulación con antagonistas de GnRH como hormona inhibidora de la hipófisis y agonistas de GnRH como inductores de la maduración ovocitaria. Una vez recuperados mediante punción folicular intravaginal, los ovocitos se analizaron en fresco ($n=26$) o tras ser vitrificados/desvitrificados en un sistema abierto (Cryotop, $n=16$).

El RNA total se aisló de muestras de donantes individualizadas (de 1 ó 2 ovocitos cada una) utilizando TRIZOL; la síntesis del cDNA se realizó mediante oligonucleótidos hexaméricos de secuencia aleatoria (random hexamers) y la retrotranscriptasa reversa clonada AMV. En cada ovocito, se investigó la expresión de los siguientes genes: IGF2R, SNRPN, DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, and DNMT3L. Las diferencias observadas se analizaron mediante el test estadístico t de Student.

RESULTADOS:

El proceso de vitrificación/desvitrificación provoca la disminución significativa de los niveles de expresión del mRNA de DNMT1 y DNMT3a ($p<0.001$ y $p=0.001$; respectivamente); sin embargo no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión del mRNA de DNMT3b y DNMT3L, siendo esta última responsable del establecimiento de la impronta genética materna. Además, se detectó la disminución significativa de los niveles de expresión del mRNA de IGF2R tras el proceso de vitrificación/desvitrificación ($p=0.002$), pero no se observó ningún cambio significativo en los niveles de SNRPN.

CONCLUSIONES:

Nuestros resultados indican que los procesos de vitrificación/desvitrificación de ovocitos MII humanos, utilizados en TRA, afectan significativamente la expresión de genes relacionados con su estado epigenético. Cabe destacar que nuestros datos se basan en ovocitos obtenidos en ciclos de donación de mujeres jóvenes y fértiles, lo que indica que los resultados obtenidos son probablemente debidos a la técnica de TRA. En este punto, son necesarios más estudios para definir claramente la significancia clínica de nuestras observaciones.

CO-017: ROMPIENDO UN MITO: EL TIEMPO ENTRE PUNCIÓN FOLICULAR Y ICSI NO TIENE IMPACTO EN LOS RESULTADOS REPRODUCTIVOS EN LOS CICLOS DE DONACION DE OVOCITOS

P. Barcena (1), M. Rodríguez (1), D. García (2), A. Obradors (2), V. Vernaev (2), R. Vassena (2)

(1)Clínica EUGIN, Barcelona, (2) Fundació EUGIN, Barcelona

rvassena@eugin.es

INTRODUCCIÓN:

Durante la FIV el ovocito está sometido a un proceso de envejecimiento fuera del folículo, en la espera para denudación y fecundación, y tras la desvitrificación; todo ello puede alterar la capacidad de desarrollo del ovocito tras fecundación. Por esta razón, los laboratorios de embriología suelen guardar tiempos estrictos en los cuales ejecutar distintas técnicas. Es habitual evitar que el ovulo permanezca demasiado tiempo afuera del folículo antes de someterlo a IVF o ICSI, para minimizar los cambios moleculares que disminuyen su capacidad al desarrollo posterior. Sin embargo, muchos protocolos de laboratorio nunca han sido probados en relación a los resultados reproductivos, y existe poca información disponible sobre los tiempos ideales a seguir para obtener mejores tasas de embarazo.

OBJETIVOS:

El objetivo de este estudio es determinar el intervalo de tiempo óptimo en el cual realizar ICSI para maximizar la tasa de fecundación (TF), calidad embrionaria (CE), y embarazo bioquímico (EB), clínico (EC) y evolutivo (EE) respecto a los tiempos de punción folicular (PF), denudación de las células del cúmulo (DN), y vitrificación/desvitrificación de los ovocitos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Este estudio incluye 3,986 ciclos de donación de ovocitos (3,178 frescos

y 808 vitrificados). Todas punciones foliculares se realizaron 36 horas después de la administración de agonistas de GnRH, y los tiempos exactos entre PF, DN, vitrificación, desvitrificación e ICSI se midieron de manera automática mediante un dispositivo de radiofrecuencias. Los tiempos de manipulación y los resultados reproductivos se analizaron mediante el test t-Student. El efecto ajustado del tiempo sobre los resultados clínicos se analizó mediante regresión logística, mientras la tendencia lineal en los resultados de embarazo mediante el test linear-by-linear. El efecto del tiempo sobre TF y CE se testeó mediante una regresión probit y ordinal, respectivamente.

RESULTADOS:

El tiempo PF-ICSI tuvo un rango entre 1h25m y 17 h13m (media 4h58m±1h fresco; 9h18m±2h vitrificados). No se evidenció un efecto del tiempo PF-ICSI sobre la TF (pfresco=0.39; pvitrificado=0.86) o en CE (pfresco=0.08; pvitrificado=0.22). Tampoco encontramos diferencia al comparar las medias de los tiempos de PF-ICSI entre los ciclos con embarazos positivos y negativos (EB, EC, EE), ya sean vitrificados (pEB =0.52; pEC =0.12; pEE =0.12) o frescos (pEB =0.74; pEC =0.81; pEE =0.99). No se encontró ningún efecto ajustado del tiempo PF-ICSI en tasa de embarazo con ovocitos vitrificados (pEB=0.59; pEC=0.20; pEE=0.13) y frescos (pEB =0.79; pEC =0.73; pEE =0.99). El estudio de la

tendencia lineal de la tasa de EC con relación a los tiempos de PF-ICSI, divididos en deciles, no evidenció una tendencia. La tasa de embarazo no cambia al variar los tiempos intermedios entre: DN y vitrificación, desvitrificación y ICSI, DN y ICSI.

CONCLUSIONES:

Nuestros resultados muestran que la ventana de tiempo efectiva para realizar la ICSI es más amplia de lo que anteriormente se pensaba, sin que se produzcan efectos deletéreos en la capacidad de los ovocitos para dar lugar a embriones competentes al embarazo. Consecuentemente no hay un momento óptimo para hacer ICSI con ovocitos frescos o vitrificados. Estos resultados se basan en un número elevado de ciclos y empleando sistemas automáticos de medición, otorgando exactitud a los tiempos recogidos. No obstante, su naturaleza retrospectiva no garantiza que no haya habido una influencia en los resultados de variables no identificadas. Por otra parte, todos los ovocitos empleados provenían de mujeres <36 años, y los resultados no se extienden a otras poblaciones. En conclusión, la organización de los tiempos en los laboratorios de embriología puede ser ajustada a las necesidades y flujos de trabajo sin crear con ello una disminución de la viabilidad de los ovocitos.

CO-018: TIEMPOS DE DESARROLLO TEMPRANO EN EMBRIONES PROCEDENTES DE OVOCITOS FRESCOS Y VITRIFICADOS

M. Martínez (1), A. Obradors(1), V. Vernaev (1), J. Santaló (2), R. Vassena (2)
(1) Clínica EUGIN, Barcelona (2) Universidad Autonoma de Barcelona, Bellaterra
rvassena@eugin.es

INTRODUCCIÓN:

La vitrificación de ovocitos causa un desensamblaje temporal de la placa metafásica y el huso meiótico, que necesita de un tiempo de recuperación después de la descongelación. Como resultado, es posible que los acontecimientos de fertilización como la extrusión del segundo corpúsculo polar (CP2) puedan verse alterados en su dinámica, con un efecto desconocido en la velocidad de desarrollo preimplantacional del embrión en la aparición y separación de los pronúcleos (2PN y BPN), y/o en los tiempos de las primeras divisiones celulares, des de la división celular hacia 2 células hasta 5 células. Aunque se ha reportado que las tasas de embarazo son similares cuando se utilizan ovocitos frescos u vitrificados, todavía no se han estudiado en profundidad los efectos que la vitrificación de ovocitos puede tener sobre la cinética de desarrollo de los embriones derivados.

OBJETIVOS:

El objetivo principal del estudio es determinar si el estado del ovocito antes de la inseminación (fresco o vitrificado), afecta a los tiempos y la dinámica del desarrollo embrionario temprano.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio de cohortes prospectivo de investigación básica, realizado entre febrero y octubre de 2014, que incluyó 203 embriones, todos ellos generados mediante ICSI (n=101 de ovocitos frescos y n=102 de ovocitos vitrificados). Los vídeos del desarrollo embrionario de los 203 embriones incluidos en el estudio fueron tomados con Primovision® Capture y los tiempos de división del desarrollo temprano se midieron con Primovision® Analyzer, considerando como tiempo 0 el inicio de la ICSI. Concretamente se midieron los siguientes tiempos: CP2 (extrusión del segundo corpúsculo polar), 2PN (aparición de los dos pronúcleos, femenino y masculino), BPN (desaparición de los dos pronúcleos, femenino y masculino), t2 (división celular hacia 2 células), t3 (división celular hacia 3 células), t4 (división celular hacia 4 células), y t5 (división celular hacia 5 células). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la generación de curvas de Kaplan-Meier para cada tiempo medido, y se realizó una prueba Log-rank para comprobar si había alguna diferencia entre los dos grupos de estudio (frescos vs vitrificado).

RESULTADOS:

La mediana de los tiempos de desarrollo (punto en el que el 50% de los embriones han alcanzado cada etapa de desarrollo) no se mostró diferente entre los embriones procedentes de ovocitos frescos y vitrificados / desvitrificados (log-rank test): 2nPB = 3: 30 vs 3:36 (p = 0,72); 2PN = 7: 43 vs 7:48 (p = 0,44); PNB = 23: 48 vs 23:46 (p = 0,64); t2 = 22: 43 vs 27:28 (p = 0,40); t3 = 37: 12 vs 39:27 (p = 0,25); t4 = 39: 10 vs 40:47 (p = 0,39); t5 = 50: 41 vs 50:27 (p = 0,79), para los ovocitos frescos y vitrificados / desvitrificados, respectivamente.

CONCLUSIONES:

Los tiempos de las primeras divisiones y eventos del desarrollo embrionario son iguales en embriones procedentes de ovocitos frescos y vitrificados; la vitrificación de los ovocitos no afecta a la cinética del desarrollo preimplantacional temprano de los embriones resultantes. Los embriones estudiados se obtuvieron a partir de ovocitos de donantes, por lo que los resultados obtenidos no son extrapolables a otras poblaciones.

CO-019: ¿ES LA TRASFERENCIA EN DIFERIDO EL FUTURO?

O. Aguirre Landaluce, A. Domingo Bilbao, JA. Agirregoikoa Iza, JL. De Pablo Franco
ART Vitoria Centro Ginecológico de Reproducción Asistida, Vitoria
oaguirre@reproduccionart.com

INTRODUCCIÓN:

La vitrificación se ha convertido en una parte fundamental en los tratamientos de reproducción asistida, actualmente se ha aumentado de forma significativa las tasas de supervivencia de ovocitos y de embriones y de este modo se han obtenido excelentes resultados clínicos. La criopreservación de embriones permite aumentar la tasa de embarazo acumulada y reducir sustancialmente la tasa de embarazo múltiple y todas sus consecuencias. La vitrificación de embriones en un programa de donación de ovocitos es una manera fácil de coordinar el ciclo de las donantes con el de las receptoras.

OBJETIVOS:

Nuestro objetivo es comprobar la eficacia de la vitrificación embrionaria para evaluar si las transferencias de embriones criopreservados tienen los mismos resultados que las transferencias en fresco en nuestro programa de donación de ovocitos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio de cohortes retrospectivo en el que hemos incluido pacientes sometidos a un tratamiento de donación de óvulos en nuestra clínica, entre enero de 2014 y marzo de 2015. Hemos analizado 68 ciclos de receptoras de ovocitos, de los cuales, 35 ciclos se han transferido los embriones en fresco (Grupo 1) y en los 33 restantes los embriones se han transferido en diferido (Grupo 2). En ambos grupos hemos incluido únicamente la primera transferencia, con

un máximo de 2 embriones en día 3 de buena calidad (A o B según los criterios de ASEBIR).

implantación fueron significativamente mayores cuando se utilizaron embriones vitrificados (ver Tabla 1).

	Embriones en fresco (Grupo 1)	Embriones vitrificados (Grupo 2)	
n	35	33	
Edad de las donantes	23,21	22,8	NS
Edad de las receptoras	41,2	41,8	NS
Días de estimulación	21	14	p=0,01
Embriones transferidos	1,44	1,24	NS
Tasa de embarazo	48%	67,7%	p=0,03
Tasa de implantación	32,9	43,9	p=0,02

La preparación endometrial se realizó con la terapia estrogénica por vía oral hasta lograr un patrón endometrial apropiado. La transferencia embrionaria fue realizada dentro de los 7 días posteriores a la preparación endometrial en el caso de las transferencias diferidas. En el caso de las transferencias en fresco fueron programadas dependiendo del día de la punción folicular de la donante.

RESULTADOS:

La edad media de las donantes y de las receptoras fue similar en ambos grupos. La duración de la preparación endometrial fue significativamente menor en el grupo de embriones vitrificados. La media de embriones transferidos en ambos grupos fue similar. En el Grupo 1, 18 de 35 transferencias fueron de un único embrión (SET) y en el Grupo 2, 25 transferencias de 33 fueron SET. Las tasas de embarazo y de

Tabla I

CONCLUSIONES:

El efecto de la estimulación ovárica con gonadotropinas exógenas puede afectar a la receptividad endometrial. El objetivo de este estudio era mostrar algo similar con nuestro programa de ovodonación. Este estudio apoya la eficacia reconocida de la vitrificación embrionaria y demuestra las altas tasas de éxito conseguidas cuando transferimos embriones en un ciclo posterior, en un útero potencialmente más receptivo con menos días de preparación con estrógenos.

Se necesitan más estudios, pero podría ser muy interesante comprobar si la transferencia en diferido representa un verdadero cambio en la forma en la que practicamos la fecundación in vitro hoy en día.

CO-020: INFLUENCIA DE LA EDAD EN EL DESARROLLO DE BLASTOCISTOS PROCEDENTES DE EMBRIONES SOBREPANTES

V. Masedo Garcia, T. Rubio Asensio, C. Carrascosa Romero, C. López Martínez, E. López López
UR. Hospital La Vega, Murcia
uravega@hospitallavega.es

INTRODUCCIÓN:

La edad de la mujer es un factor determinante para conseguir una gestación exitosa, según aumenta la edad la capacidad reproductiva disminuye y con ello la capacidad de implantación. La calidad ovocitaria se ve comprometida, aumentan las alteraciones cromosómicas en los ovocitos y disminuye la calidad embrionaria.

El desarrollo de un embrión hasta el estadio de blastocisto es un posible indicador del potencial de implantación del embrión aumentando con ello las probabilidades de embarazo.

OBJETIVOS:

Estudiar cómo influye la edad en el desarrollo hasta blastocisto de embriones sobrantes de ciclos de ICSI que no han sido seleccionados para transferir ni vitrificar en día+3 de cultivo. Estos embriones se dejan en cultivo largo hasta día +5/+6 para valorar su desarrollo y ver si tienen calidad para criopreservarse en ese día.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se realiza una revisión retrospectiva de los ciclos realizados los últimos años, se estudian ciclos de ICSI realizados en pacientes con ovocitos propios que han sido transferidos en D+3 y han tenido embriones sobrantes, se excluyen los casos de DGP, donación de ovocitos y ciclos con transferencias en D+5.

El cultivo embrionario se ha realizado de forma secuencial usando los medios de cultivo G1-plus y G2-plus de la marca Vitrolife en condiciones de 37°C y un 6% de CO₂.

Los embriones de mejor calidad fueron transferidos y vitrificados en D+3, se descartaron para cultivo largo embriones bloqueados en D+2/D+3 y embriones con < 4 células en D+3.

Se dividen 2 grupos según edad, grupo A (58 ciclos) pacientes <36 años y grupo B (58 ciclos) pacientes >36 años.

Se analiza edad, calidad de los embriones sobrantes, tasa de formación de blastocisto, % pacientes que llegan a blastocisto y % pacientes que vitrifican en D+5/6. Análisis estadístico con Chi-cuadrado.

RESULTADOS:

En el grupo A la edad media fue 32 años, se llevaron a cultivo largo 181 embriones de un total de 430 embriones obtenidos y se obtuvieron 51 blastocistos (28%). La calidad embrionaria en día +3 según los criterios de ASEBIR fue mayoritariamente tipo C (41%) siendo la suma de C+D (76%) y A+B (24%). De las 58 pacientes el 52% llegó a conseguir blastos y se pudo vitrificar en el 77% de los casos.

En el grupo B la edad media fue 38 años, 146 embriones se dejaron en cultivo largo de un total de 385 embriones obtenidos y se obtuvieron 33 blastocistos (23%). La calidad embrionaria en día +3 fue mayoritariamente también tipo C (44%), la suma de C+D (73%) y A+B (27%). El 38% de las pacientes llegó a conseguir blastocistos y se pudo vitrificar en el 59% de las pacientes.

No se obtuvo diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros estudiados en ambos grupos.

CONCLUSIONES:

En primer lugar observamos que aun siendo la mayoría de los embriones dejados en cultivo de tipo C y D en ambos grupos (76 y 73%), éstos tienen capacidad para llegar al estadio de blastocistos (28 y 23%).

En cuanto a la influencia de la edad vemos una ligera tendencia de las pacientes más jóvenes a obtener más blastocistos (52% vs 32%) y de mejor calidad, obteniendo una mayor tasa de vitrificación en este grupo frente al de mayor edad (77% vs 59%). No se han conseguido diferencias estadísticas posiblemente por reducido el número de casos.

En base a nuestros resultados el cultivo largo de los embriones sobrantes beneficia a todas las pacientes ya que aporta una oportunidad más para poder aumentar, si existe vitrificación en D+5/6, la tasa de embarazo acumulada.

BIBLIOGRAFÍA:

-Influence of advanced age on the blastocyst development rate and pregnancy rate in assisted reproductive technology.

Pantos K1, Athanasiou V, Stefanidis K, Stavrou D, Vaxevanoglou T, Chronopoulou M.

Fertility and Sterility, 2011.

-Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer.

Jones GM1, Trounson AO, Lolatgis N, Wood C.

Fertil Steril. 1998 Dec;70(6):1022-9.

CO-021: CULTIVO EMBRIONARIO EN BAJA Y ALTA TENSIÓN DE OXÍGENO: RESULTADOS OBSTÉTRICOS Y NEONATALES PRELIMINARES.

P. Gámiz Izquierdo, J.L. Romero Carbonell, JM. de los Santos Molina, T. Vitoria Samochín, V. Serra Serra, MJ. de los Santos Molina
IVI Valencia, Valencia
pilar.gamiz@ivi.es

INTRODUCCIÓN:

Las condiciones de cultivo in vitro son factores importantes que intervienen en el resultado clínico de las técnicas de FIV y pueden tener un efecto a largo plazo sobre los recién nacidos. Datos recientemente publicados por nosotros, muestran que el cultivo embrionario en bajas tensiones de oxígeno (6% O₂) mejora la calidad morfológica de los embriones en día +3, pero esta mejora no se ve reflejada en un aumento en las tasas de gestación por ciclo iniciado, en pacientes sometidas a donación de óvulos con transferencia en día +3 de desarrollo embrionario.

OBJETIVOS:

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la posible influencia del cultivo en bajas tensiones de O₂ sobre los resultados obstétricos y neonatales.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo de cohorte, realizado en 1737 ciclos de pacientes sometidas a un ciclo de donación de óvulos con transferencia embrionaria en día +3 de desarrollo y sus transferencias de embriones criopreservados entre

2010 y 2012. Un total de 285 (49.5%) y 112 (42.4%) gestaciones procedían de ciclos con embriones cultivados en 6% de oxígeno en el ciclo en fresco y criotransferencias respectivamente, mientras que 321 (49.4%) y 104 (42.7%) gestaciones, procedían de ciclos realizados con concentración de oxígeno atmosférica. Se evaluó la tasa de parto, tasa de parto gemelar, edad gestacional, peso y talla al nacer, Apgar, perímetro craneal y tasa de RNV. Para las comparaciones entre grupos se utilizó la Chi-cuadrado y la t de Student.

RESULTADOS:

Los resultados obstétricos y neonatales no se vieron afectados por la concentración de oxígeno utilizada durante el cultivo de los embriones. No se observaron diferencias estadísticamente significativas tras la transferencia de embriones en fresco en cuanto a tasa de parto/ciclo iniciado: 39.5% vs 38.2%, tasa de parto gemelar /ciclo iniciado: 16.4% vs 17.9%, edad gestacional: 37.3±3.4 vs 37.2±3.2, peso(g.): 2823±762 vs 2738±815, talla(cm): 49.2±2.9 vs 49.2±2.4, perímetro craneal(cm): 33.7±1.9 vs 33.4±2.0, Apgar 10: 9.8±0.5 vs 9.7±0.5 ni en la tasa de RNV/ciclo: 55.7%

vs 56.1%. Tampoco se encontraron diferencias tras las transferencias de embriones vitrificados en tasa de parto/ciclo iniciado: 29.4% vs 31.3%, tasa de parto gemelar /ciclo iniciado: 8.2% vs 10.4%, edad gestacional: 37.5±2.6 vs 37.1±2.9, peso(g.): 2843±855 vs 2840±751, talla(cm): 48.6±3.7 vs 48.9±3.6, perímetro craneal(cm): 34.1±2.0 vs 33.6±1.4, Apgar 10: 9.9±0.3 vs 9.9±0.3 ni en la tasa de RNV/ciclo: 37.5% vs 41.7%.

CONCLUSIONES:

Nuestros datos preliminares sugieren que el cultivo embrionario en bajas tensiones de oxígeno no mejora la tasa de RNV por ciclo y no presenta ningún impacto en los parámetros obstétricos y neonatales revisados en este estudio. Por lo que no parece necesario cultivar los embriones en bajas tensiones de oxígeno, si se realiza la transferencia en día+3.

BIBLIOGRAFÍA:

1. De los Santos MJ. Fertil Steril 2013.
2. Meintjes M. Hum Reprod 2009.
3. Waldenstrom U. Fertil Steril 2008.

Transferencias embrionarias fresco/ criopreservados	6% O ₂		20% O ₂	
	T fresco	T cong	T fresco	T cong
N° de ciclos	579	264	651	243
Tasa de parto/ ciclo iniciado	39.5 %	29.4%	38.2%	31.3%
Tasa de parto gemelar / ciclo iniciado	16.4 %	8.2%	17.9%	10.4%
Tasa de partomúltiple	0%	0%	0%	0%
Edad gestacional	37.3±3.4	37.5±2.6	37.2±3.2	37.1±2.9
Peso (gr.)	2823±762	2843±855	2738± 815	2840±751
Bajo peso (<2500gr.)	16.6%	23.7%	20.2 %	16.3%
Talla (cm)	49.2±2.9	48.6±3.7	49.2±2.4	48.9±3.6
Perímetro craneal (cm)	33.7± 1.9	34.1±2.0	33.4±2.0	33.6±1.4
Apgar 10	9.8±0.5	9.9±0.3	9.7±0.5	9.9±0.3
Total RNV	356	101	420	104
Tasa de RNV / ciclo	55.7%	37.5%	56.1%	41.7%

CO-022: ÍNDICE PROGESTERONA/OVOCITO FRENTE A NIVELES DE PROGESTERONA EN SANGRE Y SU CORRELACIÓN CON LOS RESULTADOS DE UN CICLO DE FIV.

M. Luengo Díaz, A. Clavero Gilabert, B. Romero Guadix, P. Navas Bastida, I. Sánchez Castelló, A. Guzmán Olmedo, L. Martínez Granados, M. López Regalado, L. Martínez Navarro, J. Fontes Jiménez, JA. Castilla Alcalá
Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada
marioluengod@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

Las consecuencias del aumento en los niveles de progesterona (PG) en los resultados de un ciclo de FIV continúa siendo un tema controvertido. Hasta el momento, casi todos los estudios publicados recurren a los niveles séricos absolutos de PG el día de la administración de la hCG para predecir el riesgo de sufrir una luteinización prematura. Sin embargo, en la actualidad se considera que los niveles de PG en sangre son el resultado de la suma de la PG producida por cada folículo. Así, podríamos definir el índice progesterona/folículo como la cantidad de PG media secretada por cada folículo.

OBJETIVOS:

El presente estudio tiene como objetivo la comparación de los niveles de PG séricos el día de la administración de la hCG y el índice progesterona/ovocito y el análisis de su correlación con los porcentajes de gestación clínica en ciclos de FIV/ICSI de pacientes normorrespondedoras.

MATERIAL Y MÉTODOS:

El presente estudio retrospectivo analiza 1691 ciclos de FIV/ICSI entre

2011 y 2014. Para ello, se recogieron diferentes variables como son la edad de la paciente, el número de ovocitos obtenidos, los niveles de PG el día de la administración de la hCG y el protocolo de estimulación utilizado. A partir de estos datos, se generó la variable IPO (índice progesterona/ovocito) mediante la razón PG sérica/nº de ovocitos. Para el tratamiento estadístico de los datos recabados, se realizaron distribuciones de frecuencias de las variables cualitativas y se calcularon las medias y las desviaciones estándar de las variables cuantitativas. Además se hallaron las curvas ROC para estimar la capacidad de IPO y PG de predecir embarazos. Por último, los valores de IPO y PG fueron divididos en deciles y se calcularon los porcentajes de gestación de cada uno de ellos para establecer un punto de corte a partir del cual dicho porcentaje comenzaba a disminuir.

RESULTADOS:

La media de edad de las pacientes quedó establecida en 34,2 +/- 3,9 años.

El número medio de ovocitos fue de 8,6 +/- 4,9, los niveles medios de PG fueron de 0,96 +/- 0,59 ng/mL y el IPO medio resultó en 0,16 +/- 0,19 con una tasa de

gestación clínica global del 31,2%. El área bajo la curva fue de 0,530 para la PG sérica mientras que resultó en 0,597 para el IPO. El porcentaje de embarazos disminuyó notablemente a partir de 1,6 ng/mL de PG (decil 9, descenso del 34% al 15,4%) y de un IPO de 0,2 (decil 8, del 30,4% al 19,9%).

CONCLUSIONES:

El análisis de los datos revela que el IPO permite predecir las probabilidades de embarazo clínico mejor que los niveles de progesterona sérica, por lo que la elevación de los niveles de PG en la fase folicular tardía solamente sería perjudicial si fuera consecuencia del aumento en la producción de PG por parte de cada folículo y no si se debiese al reclutamiento de un mayor número de folículos. Además, los datos permiten concluir que una elevación superior a 0,2 en la población objeto de estudio, está asociado a una reducción en el número de gestaciones, dato que podría resultar de gran utilidad a la hora de tomar decisiones respecto a la continuación o cancelación de un ciclo.

CO-023 MEJORA DEL POTENCIAL IMPLANTATORIO DE EMBRIONES DE RATÓN OBTENIDOS POR FECUNDACIÓN IN VITRO

N. Hernández Rollán (1), E. Matilla Pinto (1), C. Tobajas Vega (1), J. Mijares Gordún (1), FM. Sánchez Margallo (1), IS. Álvarez Miguel (2)
(1) Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, Cáceres, (2) Universidad de Extremadura
nhernandez@ccmijesususon.com

INTRODUCCIÓN:

Aproximadamente el 10% de las parejas presentan infertilidad de origen desconocido estando algunas de ellas relacionadas con el fallo de implantación embrionaria. Los motivos del fallo de implantación pueden ser múltiples, debido tanto a factores embrionarios como maternos.

Se ha demostrado que los factores de crecimiento epidérmicos (EGF) son imprescindibles para que el embrión se implante correctamente (Lim and Dey, 2009). El grado de afinidad de los embriones frente a EGF puede ser alterado administrando de manera exógena 4-hidroxiestradiol (4OHE2) (Parias et al., 1999) y de esta manera aumentar el éxito de implantación.

OBJETIVOS:

Evaluar la eficacia del 4OHE2 en la mejora de las tasas de implantación y gestaciones de los embriones obtenidos por fecundación in vitro.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Ratonas B6D2 fueron estimuladas con Gonadotropina Coriónica equina (eCG) y 49 horas más tarde con Gonadotropina Coriónica humana (hCG) para inducir la ovulación. Los complejos cúmulos-ovocito se añadieron al medio con los espermatozoides previamente capacitado durante 45 minutos para realizar la fecundación in vitro (FIV).

Los embriones obtenidos en estadio de mórulas se dividieron en dos

grupos para la realización del estudio. El primero (n=223) con medio de cultivo KSOM como control de la implantación en el laboratorio (FIVc) y otro experimental (n=200) con KSOM suplementado con una concentración de 0.1µg/ml de 4OHE2 (FIV0.1). Los embriones desarrollados hasta estadio de blastocisto fueron transferidos a ratonas pseudopreñadas comparando así, desarrollo evolutivo de los embriones, tasas de implantación, fetos viables y abortos. Como control (n=498) sin FIV se utilizaron embriones extraídos directamente del útero (IU) en fase de blastocisto y transferidos mediante el mismo procedimiento que los grupos FIVc y FIV0.1.

RESULTADOS:

Los resultados obtenidos muestran que la tasa de implantación con desarrollo evolutivo para los embriones obtenidos directamente del útero (grupo IU) fue de 25,7 %. Este porcentaje es mayor que el grupo de FIV control (FIVc) con el que conseguimos únicamente 7,9 % (30.67±16.51), siendo estos resultados consistentes con una disminución de la implantación de los embriones obtenidos por FIV descritos por otros autores. Cuando los embriones fueron suplementados con 0,1 µg/ml de 4OHE2, la tasa de implantación con desarrollo evolutivo de los embriones obtenidos del oviducto en fase de mórula se aumentó con respecto a los de FIVc casi el doble, alcanzando un valor de 13,3 %. Según el test de ANOVA realizado, no existen diferencias significativas entre los grupos de FIV ($p>0.05$).

CONCLUSIONES:

La posibilidad de incrementar la capacidad propia del embrión para implantarse supone un avance de enormes dimensiones en el ámbito de la reproducción asistida. En nuestro laboratorio, hemos cultivado embriones en fase de mórula con 0,1 µg/ml de 4OHE2 y el porcentaje de implantación ha aumentado considerablemente con respecto a los embriones de FIV control aunque debido posiblemente al reducido número de casos, las diferencias no son estadísticamente significativas. De la misma manera, la tasa de abortos es ligeramente menor para el grupo de FIV0.1. Podemos concluir que la suplementación de los medios con este metabolito del estradiol (4OHE2) puede mejorar la capacidad de implantación y desarrollo evolutivo de los embriones obtenidos por fecundación in vitro aunque son necesarios más estudios en este sentido para comprobar estos resultados.

BIBLIOGRAFÍA:

- Lim, H.J., Dey, S.K., 2009. HB-EGF: a unique mediator of embryo-uterine interactions during implantation. *Exp Cell Res* 315, 619-626.
- Paria, B.C., Elenius, K., Klagsbrun, M., Dey, S.K., 1999. Heparin-binding EGF-like growth factor interacts with mouse blastocysts independently of ErbB1: a possible role for heparan sulfate proteoglycans and ErbB4 in blastocyst implantation. *Development* 126, 1997-2005.

CO-024 EL ANÁLISIS MORFOCINÉTICO DE LOS BLASTOCISTOS DESVITRIFICADOS DEFINE NUEVOS MARCADORES DE ÉXITO REPRODUCTIVO

A. Galán Rivas, M. Meseguer Escrivá, A. Coelo Perles, MJ. de los Santos Molina, J. Remohí Giménez, A. Cobo Cabal
IVI Valencia, Valencia
arancha.galan@ivi.es

INTRODUCCIÓN:

La transferencia de blastocistos desvitrificados es una práctica habitual en los tratamientos de RA. En la mayoría de los casos se limita a proveer de un blastocisto apto para transferir pero sin la certeza de que la recuperación de la calidad morfológica sea signo suficiente de vitalidad.

OBJETIVOS:

Analizar la dinámica morfológica de los blastocistos desvitrificados buscando nuevos marcadores de viabilidad embrionaria.

MATERIAL Y MÉTODOS:

El estudio incluye 89 parejas sometidas a una criotransferencia de blastocistos en nuestra clínica. Los blastocistos vitrificados procedentes de ciclos de ICSI fueron desvitrificados con el método Cryotop (Kitazato). El desarrollo de los embriones desvitrificados fue observado mediante un sistema time-lapse automatizado (Embryoscope™, Vitrolife, Dinamarca). De todos los embriones transferidos, seleccionamos

aquellos con implantación conocida (n=95), el número de sacos gestacionales coincidió con el número de embriones transferidos.

Mediante el EmbryoViewer Software analizamos el grosor de la zona pelúcida (μm) y la superficie que ocupa el blastocisto (μm^2) inmediatamente después de la desvitrificación y en el instante anterior a la transferencia (>3.5h post desvitrificación). También registramos la presencia de colapso o contracción fuerte y los tiempos de cultivo en horas post desvitrificación de todas las medidas realizadas.

RESULTADOS:

Los blastocistos recién desvitrificados muestran importantes diferencias de grosor en la ZP, en función del estadio en el que fueron vitrificados (rango 8-24 μm). También existen importantes diferencias en el tamaño de los embriones, ya que aunque es frecuente que el blastocele se colapse en los procesos de vitrificación/desvitrificación no ocurre en todos ellos (rango 4843-26739 μm). El grosor de la ZP y el tamaño del blastocisto en el momento de la

transferencia embrionaria cambian significativamente a lo largo del cultivo post-desvitrificación. El grado de re-expansión del blastocele previo a la transferencia definido por el grosor de la zona pelúcida (<5 μm) y el diámetro del embrión (> 24167 μm^2) resultan en mayores tasa de implantación de los blastocistos desvitrificados. En 19 casos observamos una contracción o colapso del blastocisto no relacionándose este fenómeno con el futuro éxito reproductivo.

CONCLUSIONES:

El análisis de la dinámica morfológica de los blastocistos desvitrificados mediante la tecnología del time-lapse permite dar un valor objetivo de la calidad embrionaria en estadio de blastocisto y ofrece la posibilidad de proporcionar marcadores de éxito reproductivo alternativos a la evaluación morfológica que mejoran el diagnóstico clínico. Este y futuros estudios en cinematografía proporcionan nuevas herramientas de aplicación inmediata en el laboratorio de FIV.

CO-025 NUEVAS PERSPECTIVAS EN CRIOPRESERVACIÓN SEMINAL: CONGELACIÓN VERSUS VITRIFICACIÓN.

L. Medrano López-Tello (1), N. García (2), A. Leza (1), M. Guijarro (1), E. Rocafort (1), B. Ramos (1), MA. Fernández (1), J. Aizpurua (1), MJ. Gómez (2)
 (1) Ivf Spain, Alicante. (2) Dto. Biotecnología. Universidad Alicante, Alicante
mll.lopez@ivf-spain.com

INTRODUCCIÓN:

La criopreservación espermática es una técnica ampliamente utilizada en reproducción asistida, siendo la congelación lenta el método más extendido. Sin embargo, estudios previos han demostrado que esta produce daños en los espermatozoides a nivel de membrana, función mitocondrial, estructura del DNA, estado acrosomal, etc, haciéndose necesario una optimización de dichas técnicas. La vitrificación se presenta como una opción con la cual ya se ha conseguido el nacimiento de dos bebés sanos en 2012. Pero se desconoce cuáles son sus efectos sobre los espermatozoides y especialmente si provocan más daño con respecto al uso de la congelación clásica.

OBJETIVOS:

Comparar los daños estructurales provocados por la congelación lenta-descongelación vs vitrificación-desvitrificación mediante el empleo de biomarcadores espermáticos utilizando técnicas de microscopía óptica, fluorescencia y microscopía electrónica de barrido.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio prospectivo randomizado realizado en muestras de eyaculado obtenidas de 20 pacientes tras consentimiento informado y abstinencia de 2-5 días. Tras seminograma de acuerdo con los criterios de la Organización mundial de la salud (OMS, 2010) todas fueron diagnosticadas como normozoospermicas. Estas fueron divididas en 3 grupos: espermatozoides frescos (control), congelados y vitrificados.

La congelación se llevó a cabo usando el Kit Sperm Cryoprotect II (Nidacon) y la descongelación se realizó a

temperatura ambiente. Para la vitrificación se usó un medio compuesto (GM501Wash, Gynemed) suplementado con HSA 5 g/l y con sacarosa 0.5M. Para la desvitrificación, se utilizó el mismo medio sin sacarosa.

El daño en DNA fue evaluado mediante kit TUNEL. El estado acrosomal fue analizado mediante inmunofluorescencia directa (Pisum sativum-FITC) y la organización de los microtúbulos flagelares mediante inmunofluorescencia indirecta (β -tubulina antimouse y 488DYL anti-mouse).

Los cambios morfológicos fueron evaluados mediante microscopía óptica (MO) y microscopía electrónica de barrido (MEB).

RESULTADOS:

Al analizar los parámetros seminales encontramos que la motilidad progresiva fue significativamente mayor en muestras frescas (47.67 ± 4.08) frente a vitrificadas (18.17 ± 2.70) y congeladas (11.33 ± 2.07). Este descenso fue significativamente mayor en congeladas.

En relación a la integridad de la membrana, los daños más acusados los presentan los espermatozoides congelados (76.38 ± 1.53) seguidos de las vitrificados (55.13 ± 4.79) y frescos (87.75 ± 1.66) respectivamente, siendo estas diferencias significativas entre ellos.

El análisis morfológico reveló que la estructura más vulnerable tras congelación y vitrificación es el flagelo. El principal daño observado en el flagelo de espermatozoides congelados, mediante MEB es el enrollamiento total. Sin embargo en vitrificados los daños encontrados son menores y en forma de enrollamientos parciales.

Los daños en el flagelo pueden ser explicados por las diferencias encontradas en la inmunolocalización de la tubulina. Los espermatozoides frescos y vitrificados muestran una distribución similar (combinación de inmunolocalización continua y discontinua), mientras que en congelados la inmunolocalización de la tubulina se encuentra de forma continua o al final del flagelo.

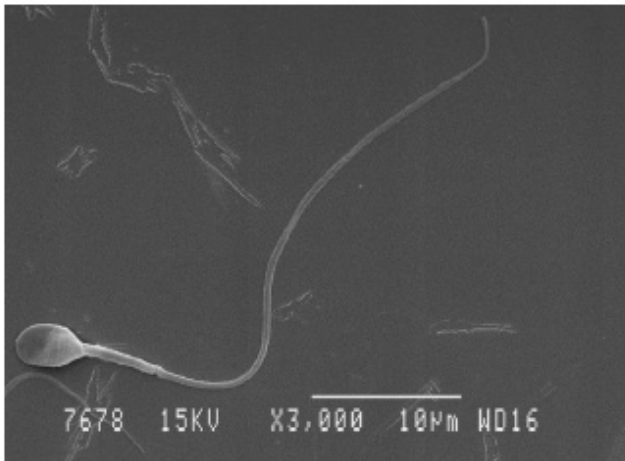
La MEB reveló que otra estructura afectada tras congelación fue la cabeza. En las microfotografías electrónicas se observan alteraciones en la integridad de la membrana, (coincidiendo con los datos de vitalidad), acrosomas alterados y roturas a nivel de la fosa de implantación. En espermatozoides vitrificados estos daños fueron menos acusados.

Al evaluar el estado acrosomal y del núcleo encontramos que ambos se ven más afectados en espermatozoides criopreservados siendo significativamente más elevados en congelados (58.19 ± 3.43 , 27.44 ± 1.97 respectivamente) frente a vitrificados (44.27 ± 3.42 , 20.04 ± 1.44 respectivamente).

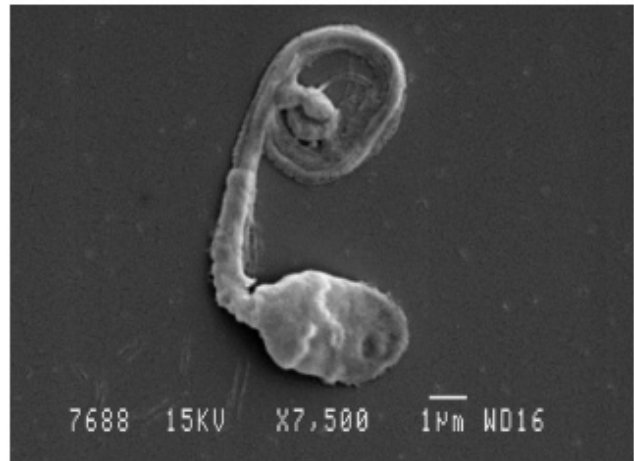
CONCLUSIONES:

El método de vitrificación empleado en nuestro estudio permite una mejor calidad espermática que la obtenida con el proceso de congelación lenta.

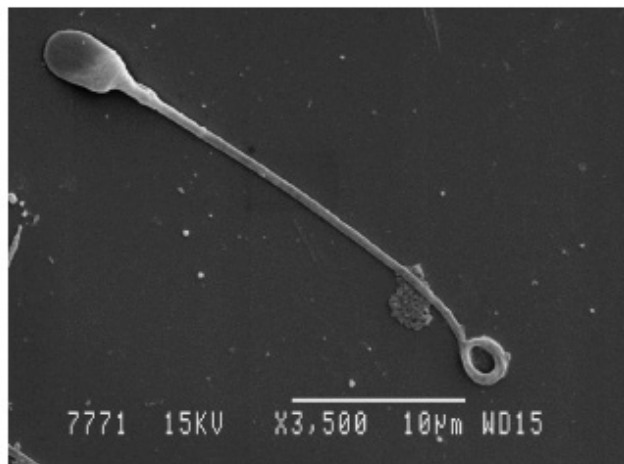
Por tanto, la vitrificación se presenta como una técnica con alto potencial para convertirse en una alternativa a la actual congelación lenta ya que además es un procedimiento rápido, sencillo y de bajo coste lo cual permitirá una mejora de los resultados en la práctica clínica.



ESPERMATOZOIDE FRESCO



ESPERMATOZOIDE CONGELADO



ESPERMATOZOIDE VITRIFICADO

CO-026 RESCATE EMBRIONARIO: RESULTADOS TRAS LA VITRIFICACIÓN DE BLASTOCISTOS PROCEDENTES DE EMBRIONES DE BAJA CALIDAD EN D+3

M. Solé Inarejos, B. Carrasco Canal, M. Parriego Beltran, F. Martínez San Andrés, B. Coroleu Lletget, M. Boada Pala, A. Veiga Lluch. Servicio de Medicina de la Reproducción, Departamento de Obstetricia, Ginecología y Reproducción, Hospital Universitari Quirón Dexeus, Barcelona, España.
miqsol@dexeus.com

INTRODUCCIÓN:

Los embriones de buena calidad son seleccionados habitualmente para la transferencia en el ciclo en fresco o para su criopreservación. Existe cierta controversia sobre la utilización de los embriones de baja calidad, siendo práctica habitual mantenerlos en cultivo hasta blastocisto y posterior criopreservación para su uso en un ciclo de criotransferencia en caso de que alcancen este estadio.

En nuestro laboratorio se lleva a cabo de forma sistemática el cultivo prolongado de los embriones de calidad insuficiente para transferencia o criopreservación en D+3.

OBJETIVOS:

Determinar la capacidad de los embriones considerados no aptos para criopreservar en D+3 de alcanzar el estadio de blastocisto y su potencial implantatorio tras su criopreservación para valorar el rendimiento de esta estrategia.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo en el que se han incluido 2615 embriones de calidad insuficiente para transferencia o criopreservación en D+3 procedentes de 1027 parejas. Se prolonga el cultivo hasta el estadio de blastocisto para su posterior criopreservación. Se han incluido embriones procedentes de ciclos de Fecundación in vitro con

ovocitos propios y de donación durante el periodo 2010-2013.

Los embriones se han clasificado en distintos grupos en función de sus características: embriones de división lenta (< 6 blastómeros en D+3), embriones con alto grado de fragmentación (>30% fragmentación citoplasmática), embriones rápidos (> 13 blastómeros o compactación en D+3), embriones multinucleados y embriones en los que no se observaron signos de fecundación.

Se han analizado los ciclos de criotrasferencia de blastocistos determinando la tasa de supervivencia y desarrollo embrionario, así como, la tasa de embarazo clínico, de implantación y de niño nacido vivo tras la transferencia de estos embriones "rescatados".

RESULTADOS:

Los embriones proceden de 520 pacientes de FIV y 507 de receptoras de ovocitos. Del total de 2615 embriones, 571 alcanzaron el estadio de blastocisto (21.8%). Los embriones del grupo de división rápida (n=642), los que no mostraron signos de fecundación (n=117) y los embriones multinucleados (n=1135) alcanzaron tasas de blastocisto similares (23,5%, 25,6% y 28.3% respectivamente). La tasa de blastocisto fue significativamente menor en los embriones con división lenta (n=575) y también en los que se observó un alto grado de

fragmentación (n=146) (7.8% y 16.4% respectivamente) (p<0.05).

La supervivencia de los blastocistos tras la desvitrificación fue del 91.0% (61/67). Se realizaron 50 transferencias con una media de embriones transferidos de 1.22±0.40. Se obtuvieron 20 embarazos clínicos (40%).

La tasa global de implantación fue del 41% (25/61), alcanzando el 46.8% para el grupo más numeroso de embriones con multinucleación (22/47). La tasa de niño nacido vivo por transferencia fue del 32% (16/50).

CONCLUSIONES:

Los embriones considerados de calidad insuficiente pueden ser rescatados mediante el cultivo largo y la vitrificación obteniendo un elevado rendimiento de esta estrategia en términos de tasa de blastocisto y tasa de embarazo y niño nacido vivo en casa.

A la vista de los resultados los embriones multinucleados no deberían ser descartados en D+3 dejándolos siempre en cultivo hasta blastocisto.

BIBLIOGRAFÍA:

Kaartinen N, Das P, Kananen K, Huhtala H, Tinkanen H. Can repeated.

IVF-ICSI-cycles be avoided by using blastocysts developing from poor-quality cleavage stage embryos? *Reprod Biomed Online*. 2015;30(3):241-7.

CO-027 ¿RESPONDEN LOS EMBRIONES BIOPSIADOS DE DISTINTA FORMA A LOS PROCESOS DE VITRIFICACIÓN Y DESVITRIFICACIÓN?

MC. Tió Marquina (1), J. Ten Morro (1), J. Guerrero Villena (1), A. Rodríguez Arnedo (1), MD. Pérez Izquierdo (2), B. Moliner Renau (1), A. Bernabéu García (1), J. Llácer Aparicio (1), R. Bernabéu Pérez (1)

(1) Instituto Bernabeu Alicante, Alicante (2) Instituto Bernabeu Cartagena, Cartagena
jten@institutobernabeu.com

INTRODUCCIÓN:

Los avances en las técnicas de criopreservación embrionaria han logrado alcanzar excelentes resultados de supervivencia en los diversos estadios embrionarios. La estrategia de selección embrionaria mediante screening cromosómico completo (CCS) nos obliga en numerosas ocasiones a criopreservar embriones, por ejemplo en los casos en los que no es posible biopsiar en día 5 de cultivo y esperamos a realizar la biopsia en día 6, criopreservando todos los embriones en espera de obtener el diagnóstico. Además, en general contar con embriones cromosómicamente normales nos permite optar por la transferencia de un único embrión en fresco, destinando los demás embriones sin alteraciones a ser criopreservados. Para los pacientes la inversión económica y emocional que supone un tratamiento con biopsia embrionaria es enorme y por ello nos planteamos un seguimiento exhaustivo de cómo esos embriones que hemos criopreservado responden ante el proceso de vitrificación.

OBJETIVOS:

Comparar las tasas de supervivencia de los embriones biopsiados frente a los no biopsiados para determinar si el

proceso de biopsia puede suponer un perjuicio para la criopreservación.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Recogimos los datos de los tratamientos de transferencias de embriones criopreservados llevadas a cabo desde enero a diciembre de 2014 en nuestro centro. Finalmente se incluyeron 522 casos de los cuales 51 correspondieron a embriones biopsiados previamente a ser vitrificados y 471 a embriones no sometidos a dicho proceso. Se realizó una regresión lineal ajustada por origen ovocitario (propio o donado). Todas las criopreservaciones se realizaron mediante vitrificación y desvitrificación empleando medios Irvine Scientific con el protocolo recomendado por el fabricante.

RESULTADOS:

La tasa de supervivencia de los embriones biopsiados es comparable a la de embriones sin biopsiar (100% y 94.5% respectivamente, $p=0.053$). Si bien no hay diferencias estadísticamente significativas estas rozan la significación a favor de los embriones biopsiados, en los cuales hasta el momento encontramos un 100% de supervivencia.

CONCLUSIONES:

La biopsia embrionaria en estadio de blastocisto supone una alteración del estado del embrión que ha demostrado no comprometer su capacidad de implantación, pero aún desconocíamos si puede, de algún, modo alterar la respuesta de los embriones al proceso de criopreservación.

Observamos hasta el momento una supervivencia del 100% en estos embriones que hacen sospechar que haber sido sometidos al proceso de biopsia pueda tener alguna ventaja respecto al resto de embriones. El proceso de equilibrado con crioprotectores podría mejorarse debido a la exposición más directa del embrión al medio de equilibrio, ya que en estos embriones la zona pelúcida ha sido perforada y además están parcial o totalmente fuera de ella. De hecho, hemos observado que el tiempo que tardan estos embriones en completar el equilibrado es generalmente menor. Esta elevada supervivencia permite confiar en la biopsia embrionaria, ya sea para realizar un CCS o un diagnóstico de una enfermedad monogénica, con vitrificación de todos los embriones si fuera necesario sin que ello suponga un perjuicio para el embrión.

CO-028 RECALENTAMIENTO ULTRA-RÁPIDO: ALTAS TASAS DE RECUPERACIÓN DE OVOCITOS VITRIFICADOS EN EL SISTEMA CERRADO SAFESPEED. UN NUEVO PARADIGMA EN CRIOPRESERVACION.

M. Gallardo Molina (1), M. Hebles Duvison (2), B. Migueles Pastor (2), M. Dorado Silva (1), L. Aguilera Duvison (2), M. González Martínez (2), P. Piqueras Trilles (1), P. Sánchez Martín (2), F. Sánchez Martín (2), R. Risco Delgado (3)

(1) Fundación Ginemed, Sevilla, (2) Clínicas Ginemed, Sevilla, (3) Centro Nacional de Aceleradores. Universidad de Sevilla.

mgallardo@ginemed.es

INTRODUCCIÓN:

Actualmente la vitrificación de óvulos es una técnica que ha alcanzado altos niveles de eficiencia, con numerosas aplicaciones y que se utiliza a diario en la práctica clínica. Según las directrices de 2013 de la American Society of Reproductive Medicine (ASRM) ya no se considera una técnica experimental, dado que hay evidencia de que las tasas de fecundación y embarazo son similares a las obtenidas en fresco, y no se ha observado ningún efecto negativo en la descendencia.

Sin embargo, la mayoría de evidencia acumulada procede de sistemas de vitrificación abiertos, en los que los óvulos entran en contacto directo con el nitrógeno líquido. Se pone en duda si se pueden obtener resultados igualmente satisfactorios con un sistema de vitrificación cerrado. Esto se atribuye principalmente a la creencia de que el diseño cerrado de estos sistemas implica obtener tasas de transferencia térmica inferiores en la vitrificación y, sobre todo, el recalentamiento, lo que es vital para la supervivencia de los óvulos [1].

OBJETIVOS:

Determinar la eficacia de un sistema cerrado de vitrificación para la criopreservación de óvulos de donante.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se incluyeron 143 óvulos provenientes de 16 ciclos de donación sincronizada realizados entre Mayo y Noviembre de 2014. Los óvulos se dividieron aleatoriamente en 2 grupos. En el grupo experimental la intervención consistió en vitrificar y recalentar los óvulos a las

2 horas de la punción ovárica, utilizando el sistema cerrado de vitrificación SafeSpeed (Safepreservation, España), antes de su fecundación.

Ambos grupos fueron fecundados mediante ICSI simultáneamente (+4 horas) y fueron incubados juntos en la misma placa de cultivo con medios secuenciales, a 6%CO₂, 37°C y 96% de humedad relativa. En día +3 se evaluaron en base a la clasificación de ASEBIR (2009) y fueron transferidos, vitrificados o descartados en función de su calidad.

Se estableció la tasa de fecundación normal (2 pronúcleos a las 17±4 horas) como principal indicador de eficacia. Los indicadores secundarios de eficacia evaluados fueron la supervivencia morfológica de los ovocitos a las 2 horas del recalentamiento, la tasa de división embrionaria (embriones evolutivos en día+3) y la calidad embrionaria (embriones tipo A y B según ASEBIR).

RESULTADOS:

66 de 68 óvulos (97.1%) del grupo experimental sobrevivieron a la vitrificación. La tasa de fecundación fue del 74.6% en el grupo control frente al 77.3% en el grupo experimental. La tasa de embriones evolutivos en día 3 fue de 83.9% vs. 87.3% y el porcentaje de embriones de buena calidad en día 3 (tipo A+B según ASEBIR) fue de 53.2% vs. 54.1% en grupo control frente al experimental, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) entre el grupo control y experimental en ninguno de los indicadores de eficacia estudiados.

CONCLUSIONES:

El diseño del estudio, con ovocitos hermanos provenientes de un mismo ciclo de estimulación de una misma donante, fecundados y cultivados en las mismas condiciones, nos permite reducir el número de variables en juego a sólo una: la vitrificación y recalentamiento de los óvulos antes de su fecundación.

La tasa de supervivencia obtenida, del 97%, supera los niveles de referencia establecidos recientemente [2]. Se atribuye haber conseguido estos niveles de eficacia a la optimización de las tasas de recalentamiento [1] por las que se caracteriza el sistema de vitrificación Safespeed, desarrollado por el grupo de criobiología de la Universidad de Sevilla.

Dado que se han obtenido resultados similares en ambos grupos en cuanto a fecundación y calidad embrionaria, podemos concluir que la vitrificación de óvulos de donante con el sistema cerrado SafeSpeed no repercute negativamente en los resultados obtenidos con los mismos en un programa de reproducción asistida.

BIBLIOGRAFÍA:

1. S. Seki, P. Mazur. Ultra-rapid warming yields high survival of mouse oocytes cooled to -196 °C in dilutions of a standard vitrification solution. *PLoS One*. 7 (2012) e36058.
2. S. I. R. M. Alpha. The Alpha consensus meeting on cryopreservation key performance indicators and benchmarks: proceedings of an expert meeting. *Reprod Biomed Online*. 25(2) (2012) 146.

CO-029 ALTERACIONES DE LOS EMBRIONES ANEUPLOIDES EN SU MORFOCINÉTICA Y PERFIL TRANSCRIPTÓMICO

M. Vera Rodríguez (1), S. Chávez (2), C. Rubio Lluesa (1), R. Reijo Pera (2), C. Simón Vallés (1)
 (1) Igenomix, Paterna, Valencia. (2) Stanford University, USA
maria.vera@igenomix.com

INTRODUCCIÓN:

En la actualidad, se realizan más de medio millón de ciclos de fecundación in vitro (FIV) cada año, resultando en un total de 100.000 bebés, equivalentes a un 1.5% de todos los recién nacidos en Europa (1). A pesar de todos los avances en el campo de la medicina reproductiva y del incremento en el número de estudios sobre desarrollo embrionario, las tasas de recién nacido vivo por ciclo han aumentado tan solo un 10% durante los últimos 25 años (2). Este hecho podría estar debido a la alta incidencia de aneuploidías en el embrión humano (3). Hasta ahora, las herramientas más usadas en la clínica para la selección embrionaria tienen un bajo poder predictivo, como la evaluación morfológica o cinética, o requieren de técnicas invasivas, como el diagnóstico genético preimplantacional.

OBJETIVOS:

El objetivo de este estudio fue el análisis simultáneo de la dotación cromosómica, la morfocinética y el perfil transcriptómico en un mismo embrión, con la finalidad de esclarecer las causas y consecuencias de las aneuploidías durante el desarrollo embrionario.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se descongelaron 117 embriones humanos en estadio pronuclear que habían sido previamente donados a investigación (Ver Figura 1). Aquellos cigotos que sobrevivieron al proceso de congelación/descongelación (n=85; edad materna: 33.7±4.3 años) fueron cultivados durante diferentes períodos de tiempo que variaron entre 2 y 65 horas. El cultivo embrionario fue monitorizado mediante un sistema de time-lapse (EevaTM, Auxogyn, USA) con la finalidad de obtener las

características morfológicas y cinéticas de cada embrión.

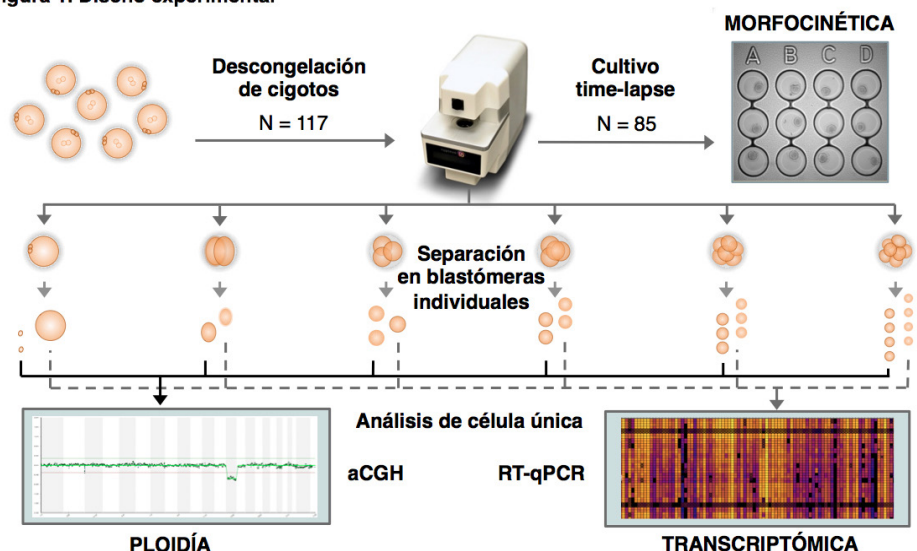
Tras el cultivo, cada embrión fue disgregado en células individuales y la mitad de las células de cada embrión fueron analizadas con arrays de hibridación genómica comparada (aCGH; Illumina, UK) para conocer su dotación cromosómica completa. La otra mitad de las blastómeras de cada embrión fueron analizadas usando un sistema qPCR de microfluidos para célula única (Biomark HD, Fluidigm, USA) con la finalidad de investigar la expresión de 87 genes seleccionados de la literatura previa. Para el análisis de los vídeos de time-lapse se empleó el software ImageJ, para la detección de diferencias significativas se realizaron diferentes test estadísticos en el programa SPSS, y para el estudio de los datos de expresión génica se utilizaron el software R y la plataforma Babelomics.

RESULTADOS:

De los 85 embriones analizados, obtuvimos datos de expresión génica en 119 blastómeras, provenientes de un total de 78 embriones. Por otro lado, se obtuvieron resultados informativos de aCGH en un total de 89 células de 57 embriones. El tiempo entre la desaparición de los pronúcleos (PNd) y el comienzo de la primera citocinesis fue el único parámetro cinético que fue estadísticamente significativo entre embriones aneuploides y euploides (2.8 h vs. 2.4 h, respectivamente; P=0.02). Además, se detectaron diferencias significativas en el perfil transcriptómico de los embriones aneuploides frente a los euploides durante el rango de tiempo entre la PNd y las siguientes 30 horas de desarrollo.

Más concretamente, un total de 20 genes se expresaron diferencialmente entre embriones aneuploides y euploides (P<0.05), estando la mayoría de ellos relacionados con procesos del ciclo celular y de daño en el DNA.

Figura 1. Diseño experimental



CONCLUSIONES:

Este es el primer estudio en el que se analizan el estadio cromosómico, el perfil transcriptómico y la morfocinética en un mismo embrión. Nuestros resultados muestran como los parámetros cinéticos, a pesar de ser diferentes entre embriones aneuploides y euploides, no son lo suficientemente eficaces como herramienta predictiva de la dotación cromosómica del embrión. Sin embargo, el análisis

transcriptómico mostró como los embriones aneuploides poseen alterados los niveles de expresión de 20 genes, los cuales pueden ser utilizados como una base sólida para el desarrollo de nuevas técnicas no-invasivas en el laboratorio de FIV.

BIBLIOGRAFÍA:

(1) Sullivan, E. A. et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies (ICMART) world

report: assisted reproductive technology 2004. Hum. Reprod. 28, 1375-1390 (2013).

(2) Human Fertilization Embryology Authority (HFEA). Report in Fertility Treatment (2013).

(3) Chavez, S. L. et al. Dynamic blastomere behaviour reflects human embryo ploidy by the four-cell stage. Nat. Commun. 3, 1251 (2012).

CO-030: DESARROLLO Y VALIDACION DE UN NUEVO PROTOCOLO BASADO EN SECUENCIACION MASIVA PARA EL ESTUDIO DE LA ANEUPLOIDIA EMBRIONARIA: LA NUEVA GENERACION DEL DGP.

R. Bautista Llacer (1), X. Vendrell Montón (1), V. Fernandez Pedrosa (1), J.C. Trivino Pardo (1), C. Collado Mico (1), G. Marco Puche (1), E. Ferrer Robles (2), C. Calatayud Lliso (2), M. Ruiz Jorro (2)

(1) Sistemas Genómicos, Paterna, Valencia, (2) CREA - Valencia. Valencia. España
javier.vendrell@sistemasgenomicos.com

INTRODUCCIÓN:

La secuenciación masiva (NGS, Next Generation Sequencing) permite conocer la secuencia completa de un genoma de forma rápida y en varias muestras simultáneamente. Esto es básico en DGP, pero el traslado a célula única representa un reto. Incluye una amplificación del genoma unicelular y la construcción de librerías de fragmentos antes de la secuenciación. Esto podría incluir sesgos y producir errores diagnósticos. Asimismo, el análisis bioinformático resulta capital. La validación de esta nueva tecnología resulta radicalmente importante antes de su aplicación clínica. La calidad del ADN, cobertura, rendimiento, profundidad de lectura y reproducibilidad deben ser validadas antes de su aplicación clínica en el DGP de aneuploidías: DGPa-NGS.

OBJETIVOS:

Validar la secuenciación masiva en célula única para su aplicación en el diagnóstico genético preimplantación (DGP).

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se utilizaron tres tipos de muestras, i) amniocitos únicos previamente cariotipados (n=24) (46, XX), (47, XY,

+18), (47, XY, +18), ii) blastómeros únicos (n=10) y iii) ADN genómico de líquido amniótico cariotipado (n=8) (46, XX), (46, XY), (47, XY, +18) (47, XY, +21). Los genomas fueron secuenciados de forma ciega. Posteriormente, se diseñó un algoritmo bioinformático ad hoc. Los resultados se contrastaron en un análisis multivariable. El ADN unicelular fue amplificado mediante whole genome amplification (WGA). La calidad se estimó por absorbancia, fluorescencia y electroforesis. Se construyeron las librerías de fragmentos y fueron etiquetadas añadiéndoles secuencias específicas y adaptadores de la plataforma Illumina. La calidad/cantidad se valoró en Qubit® y Bioanalyzer®. La mezcla equimolar se sometió a bridge-PCR para la amplificación clonal. La secuenciación fue mediante SBS (Sequencing by Synthesis) y paired-ends (100nt x2) en la plataforma MiSeq® (Illumina). Las lecturas fueron mapeadas frente al genoma Hg19 mediante el algoritmo BWA. Se estimó el % lecturas mapeadas (properly-pair), distribución homogénea/cromosoma y cobertura/kilobase.

RESULTADOS:

Las librerías presentaron un tamaño de ~1000 pb y una concentración de 5nM. Se obtuvo una densidad de clusters

óptima para MiSeq® (~1000 K/mm²). Las bases con q>30 fueron superiores al 90%. No se detectaron desviaciones asociadas a la técnica WGA. El porcentaje de lecturas mapeadas on target superó el 98%. Se comprobó la reproducibilidad, rendimiento, sensibilidad, exactitud/precisión y veracidad (concordancia). En todos los casos se obtuvieron valores superiores al valor de corte.

CONCLUSIONES:

La aplicación de la NGS en célula única rinde resultados óptimos y reproducibles. La calidad del ADN y el algoritmo bioinformático son claves para su aplicación en DGP. La validación de esta revolucionaria aproximación diagnóstica confirma que, la técnica DGPa-NGS permite el estudio de las aneuploidías y las pérdidas/ganancias de fragmentos cromosómicos de forma extremadamente precisa, tanto en blastómeros como en muestras de trofooctodermo. Las principales ventajas del DGPa-NGS, son el reducido coste del análisis y la máxima cobertura a nivel de cromosoma que se puede ofrecer partiendo de mínimas cantidades de ADN.

CO-031: DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA, COMBINANDO DETECCIÓN DE ANEUPLOIDÍAS Y TRASTORNOS MONOGENÉTICOS.

LA. Alcaraz Mas (1), V. Penacho (1), B. Ramos (2), M. Fernández (2), S. González Reig (1), S. Rogel (3), J. Aizpurua (3)
(1) Bioarray, Elche, Alicante, (2) IVF-Spain, Alicante, (3) Universidad Pablo Olavide, Sevilla
luis.alcaraz@bioarray.es

INTRODUCCIÓN:

La aplicación del diagnóstico genético preimplantacional (DGP) en FIV supuso un revolucionario procedimiento clínico a finales de los años 80, cuyo objetivo era minimizar el riesgo de trastorno genético de los embriones implantados. De esta manera, predecir tanto el genotipo como el cariotipo de un embrión antes de su transferencia mejora el pronóstico de implantación así como la tasa de embarazo. Actualmente, el DGP mediante array-CGH es una técnica habitual en FIV dada su alta sensibilidad en la detección de aneuploidías.

Por otro lado, para la detección de enfermedades monogénicas, se utiliza una combinación de distintas técnicas, como son la secuenciación capilar, análisis de fragmentos, etc., para desarrollar tanto el método directo (para detectar la mutación) como el indirecto (para confirmación de resultados). Todo ello se traduce en que un laboratorio de DGP debe poner a punto múltiples técnicas para cada caso, especialmente si se quiere combinar estudio de aneuploidias con enfermedades monogénicas.

Más recientemente, la secuenciación masiva (NGS) constituye una alternativa eficaz en la identificación de variaciones en número de copia (CNV) y la confirmación de mutaciones puntuales. En este estudio, se ha evaluado la aplicabilidad de la plataforma Ion-

Torrent™ en la detección simultánea de aneuploidías, translocaciones desbalanceadas y alteraciones monogénicas en más de 100 casos de DGP.

OBJETIVOS:

Desarrollar un protocolo sencillo y eficaz que permita combinar detección de aneuploidías y enfermedades monogénicas mediante secuenciación masiva.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se ha realizado un estudio genético doble-ciego de más de 100 muestras con el objetivo de validar la mencionada plataforma NGS frente a aCGH 24Sure® para screening de aneuploidías. En él han participado 35 parejas (edad materna media 39.1±4.11 años) a lo largo de 40 ciclos FIV. El análisis se ha realizado a partir de biopsias de trofoectodermo. Los productos amplificados fueron paralelamente estudiados por aCGH y NGS. El análisis de CNV determinó el estado de ploidía con cobertura de secuenciación sobre el genoma $\leq 0.01X$. Además, se ha realizado un estudio en dos parejas cuyos varones fueron diagnosticados como portadores de NF1 y NF2, identificando las mutaciones c.647T>C (17q11.2 gen NF1) y c.185T>C (22q12.2 gen NF2), respectivamente. Los resultados se compararon con métodos clásicos, como secuenciación capilar y análisis de fragmentos.

RESULTADOS:

Se ha puesto a punto un protocolo para la realización del cribado de aneuploidías en embriones mediante secuenciación masiva, combinado con diagnóstico de enfermedades monogénicas. El estudio de validación ha aportado un 97.9% de concordancia (98/100; 95% Intervalo de confianza: 92.6%-99.7%) tanto para la detección de aneuploidías como de translocaciones desbalanceadas de origen parental mediante NGS frente a aCGH. La tasa de éxito en DGP para NF1 y NF2 fue del 100%.

CONCLUSIONES:

Esta estrategia de NGS es totalmente consistente con el DGP tanto para la detección de alteraciones cromosómicas como de mutaciones puntuales, mejorando así el pronóstico de implantación y la tasa de embarazo. Permite modelizar su capacidad de resolución en función de la demanda de análisis de embriones en DGP. A partir de una única biopsia es posible combinar la detección, total y parcial, de aneuploidías en los 24 cromosomas, productos desbalanceados y trastornos monogénicos de origen parental, con un protocolo simplificado, lo cual garantiza un servicio más accesible y eficaz.

CO-032 LOS POLIMORFISMOS CROMOSÓMICOS INCREMENTAN LA TASA DE ANEUPLOIDÍAS EN GAMETOS Y EMBRIONES

R. Morales Sabater (1), B. Lledó Bosch (1), JA. Ortiz Salcedo (1), E. García Hernández (1), H. Blanca Ordoñez (2), J. Guerrero Villena (2), J. Ten Morro (2), J. Llácer Aparicio (2), R. Bernabeu Pérez (2)

(1) Instituto Bernabeu Biotech, Alicante (2) Instituto Bernabeu Alicante, Alicante
rmorales@institutobernabeu.com

INTRODUCCIÓN:

Los polimorfismos cromosómicos se han considerado hasta ahora como normales porque afectan a regiones de heterocromatina y ocurren en la población general sin significado clínico aparente. Sin embargo, estudios previos han descrito una mayor incidencia de estas variantes en pacientes infértiles, como parejas que han sufrido abortos de repetición o varones con mala calidad seminal o elevada tasa de aneuploidías en espermatozoides, aunque el mecanismo por el cual podrían afectar a la fertilidad es aún desconocido. Por otra parte, la incidencia de anomalías cromosómicas en gametos y embriones humanos es muy elevada incluso en casos de donación de ovocitos lo que da lugar a fallos de ciclos FIV. Esto podría deberse a la edad materna, a la estimulación ovárica o a un factor masculino pero la mayoría de veces no se conoce la causa.

OBJETIVOS:

Estudiar si existe una asociación entre la presencia de polimorfismos cromosómicos y la tasa de aneuploidías en gametos y embriones.

MATERIAL Y MÉTODOS:

En este estudio se ha analizado de forma retrospectiva la tasa de aneuploidías en espermatozoides evaluada en 145 varones infértiles mediante FISH (hibridación in situ fluorescente) con sondas para los cromosomas X, Y, 18, 13 y 21. Los varones infértiles fueron clasificados en dos grupos: portadores

y no portadores de polimorfismos cromosómicos. Por otra parte, para estudiar la posible influencia de polimorfismos en la tasa de aneuploidías en ovocitos, se evaluó la tasa de aneuploidías embrionarias (analizada por array-CGH) de 301 embriones procedentes de ciclos de donación de ovocitos llevados a cabo entre 2013 y 2014, en los cuales las donantes de ovocitos se dividieron en dos grupos según si eran o no portadoras de polimorfismos. Se seleccionaron ciclos de donación porque las donantes son mujeres jóvenes de edad similar y con función ovárica normal. El array-CGH se llevó a cabo en células de trofoblasto procedentes de embriones en día 5, usando los microarrays SurePrint G3 8x60K CGH de Agilent.

RESULTADOS:

La tasa de aneuploidías en espermatozoides (FISH en espermatozoides alterado) evaluada en 145 varones infértiles se comparó en ambos grupos (portadores y no portadores de polimorfismos), observándose una diferencia estadísticamente significativa (37,7% en varones portadores frente a 16,3% en no portadores, $p < 0,05$). La tasa de FISH alterado fue superior en el grupo de varones portadores de polimorfismos en cromosomas acrocéntricos (40%), siendo la variante 21ps+ la que demostró mayor correlación con las aneuploidías en espermatozoides (58,3% de FISH alterado en varones 21ps+).

La asociación entre los polimorfismos cromosómicos en la mujer y la tasa

de aneuploidías en ovocitos se investigó analizando las aneuploidías embrionarias en 301 embriones procedentes de ciclos de donación de ovocitos (de donantes portadoras y no portadoras en los que se excluyó la influencia del factor masculino seleccionando aquellos donde el varón tenía cariotipo y FISH en espermatozoides normal). La media de edad fue de 25,8 años. La tasa de aneuploidías embrionarias fue superior en el grupo de donantes portadoras de polimorfismos que en el grupo de donantes con cariotipo normal (50,0% frente a 27,7%; $R = 2,747$, 95% IC = 1,039-7,264).

CONCLUSIONES:

Nuestros datos demuestran una relación entre polimorfismos cromosómicos y aneuploidías en espermatozoides y blastocistos. Los varones infértiles portadores de polimorfismos tienen mayor incidencia de aneuploidías en espermatozoides. Por otra parte, por primera vez se demuestra una correlación negativa entre polimorfismos en la mujer y aneuploidías embrionarias. Las mujeres portadoras de polimorfismos tienen un mayor riesgo de tener embriones aneuploides que no implantarán o darán lugar a aborto. Por tanto, según nuestros resultados la realización de un screening cromosómico completo (CCS) de los embriones procedentes de varones o mujeres portadores de polimorfismos mejoraría los resultados de un ciclo FIV seleccionado embriones euploides.

CO-033 KARYOMAPPING COMO HERRAMIENTA PARA ANÁLISIS DE ANOMALIAS CROMOSÓMICAS NO DETECTABLES MEDIANTE TÉCNICAS CONVENCIONALES: DETECCIÓN DE EMBRIONES NORMALES/EQUILIBRADOS, MICRODELECCIONES/MICRODUPLICACIONES Y TRIPLOIDES/HAPLOIDES.

C. Arjona Fernández (1), E. García Guixé (1), M. Konstantinidis (2), E. Armenti (2), R. Prates (2), C. Giménez Sevilla (1), M. Sandalinas Alabert (1) (1) Reprogenetics Spain S.A., Barcelona, (2) Reprogenetics carjona@reprogenetics.es

INTRODUCCIÓN:

El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) permite la detección de anomalías genéticas en el embrión antes de su transferencia al útero materno. Para ciertos pacientes, el DGP mediante las técnicas convencionales no permite realizar un diagnóstico fiable. Además, las técnicas convencionales no permiten diferenciar los embriones portadores equilibrados de los no portadores en pacientes que presentan en su cariotipo reorganizaciones cromosómicas estructurales. Se presenta una nueva herramienta diagnóstica, la técnica del Karyomapping, que permite solucionar todas estas limitaciones.

OBJETIVOS:

Con este trabajo se pretenden abordar 3 objetivos. En primer lugar, investigar el potencial de la técnica del Karyomapping (Illumina, USA) para translocaciones y para diferenciar embriones normales de los equilibrados y desequilibrados. En Segundo lugar para detectar otras anomalías específicas difíciles de identificar mediante otro tipo de análisis (microdelecciones/microduplicaciones). En tercer lugar, establecer el % de blastocistos triploides/haploides, no diferenciables mediante técnicas de DGP convencionales.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se utilizó la técnica de Karyomapping+aCGH para analizar 55 blastocistos provenientes de los siguientes casos de FIV-DGP: - 33 blastocistos de 4 casos de portadores de translocaciones recíprocas: t(6;8)(q15;p21.1), t(4;15)(q26;q26.3), t(9;22)(q22.1;q11.2), t(X;14)(p22;q11.2); - 22 blastocistos de 3 casos de portadores de microdelecciones/microduplicaciones: del15q132q13.3 (1.9Mb), del16p11.2 (569Kb), dupXp11.4 (155Kb).

La incidencia de triploidía/haploidía fue investigada en 1896 blastocistos provenientes de 312 casos de FIV-DGP en pacientes portadores de una enfermedad monogénica.

RESULTADOS:

En el caso de las translocaciones recíprocas, mediante la técnica de Karyomapping se obtuvieron los mismos resultados de aneuploidías que mediante la técnica de aCGH. De los 33 embriones analizados se obtuvieron un total de 12 embriones euploides (36%) y mediante la técnica de Karyomapping fue posible diferenciar los embriones portadores equilibrados de los no portadores.

En el caso de las microdelecciones/microduplicación, fue posible establecer el estatus de portado/no portador en los 22 embriones analizados, hecho que era técnicamente imposible mediante otras técnicas diagnósticas, como el aCGH estándar, qPCR o FISH.

En cuanto al estudio de la ploidía de los embriones se encontraron un 0.5% de embriones triploides (10/1896) y un 0.4% de embriones haploides (7/1896) en estadio de blastocisto.

CONCLUSIONES:

El protocolo de Karyomapping utilizado ha permitido el DGP en casos en el que la aproximación convencional no era posible. Esta técnica ha detectado ganancias y pérdidas de segmentos cromosómicos implicados en translocaciones recíprocas de un mínimo de 5.3Mb. Además, permite diferenciar embriones portadores de no portadores en casos de translocaciones recíprocas y, combinado con los arrays de aCGH permite analizar todo el complemento cromosómico de los embriones. Esta técnica también permite detectar microdelecciones y microduplicaciones y fenómenos biológicos como la triploidía y la haploidía no detectables por otros métodos convencionales de DGP.

CO-034 RESCATE DE EMBRIONES SIN DIAGNÓSTICO CONCLUYENTE EN LOS CICLOS DE PGS EN D+3

M. Parriego Beltran, Ll. Coll Luján, S. Mateo Cuadros, M. Tresánchez Parés, B. Coroleu Lletget, M. Boada Palà, A. Veiga Lluch
Dexeus Salud de la mujer, Barcelona
monpar@dexeus.com

INTRODUCCIÓN:

Disponer de una única célula para el análisis en los ciclos de Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) en D+3 conlleva que si el material biopsiado se encuentra en condiciones subóptimas no pueda obtenerse un diagnóstico concluyente. Al realizar screening de aneuploidías (PGS) en D+3 y análisis cromosómico mediante a-CGH, la no obtención de resultados (SD) suele darse principalmente por dos motivos: por no amplificación del DNA del blastómero biopsiado o por dificultades en la interpretación del resultado. El destino de estos embriones del que no se conoce el estatus genético queda en manos de los pacientes, algunos reacios a su utilización con fines reproductivos. En nuestro centro, cuando no se dispone de un diagnóstico concluyente de un embrión biopsiado en D+3, si alcanza el estadio de blastocisto, se propone a la pareja rebiopsiar el embrión y, en caso de que sea cromosómicamente normal, se plantea la transferencia en un ciclo diferido.

OBJETIVOS:

El objetivo del presente estudio es evaluar la frecuencia y la utilidad del reanálisis de embriones con resultado no concluyente en el ciclo de PGS. Se pretende también conocer si existe correlación entre el origen del no diagnóstico en D+3 y la tasa de blastocisto y/o la normalidad cromosómica.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se han incluido ciclos de PGS con biopsia en D+3 y transferencia en D+5 realizados entre junio de 2013 y diciembre de 2014. Se biopsió un único blastómero por embrión y el análisis cromosómico se realizó utilizando a-CGH. En caso de no obtenerse un diagnóstico concluyente si el embrión alcanzaba el estadio de blastocisto se ofrecía a los pacientes rebiopsiarlo y vitrificarlo para su uso diferido si resultaba euploide, como alternativa a su criopreservación como SD. Se biopsió el trofocotermo de los blastocistos SD (4-10 células) y se realizó el análisis utilizando también a-CGH. Se analizó el porcentaje de embriones SD que alcanzaron el estadio de blastocisto y el resultado del reanálisis. Se analizó la correlación entre el origen del no diagnóstico y el desarrollo hasta blastocisto y constitución cromosómica.

RESULTADOS:

Se biopsiaron y analizaron un total de 1972 embriones en D+3 y en 268 de ellos no se obtuvo un diagnóstico concluyente (13,6%). Ciento cuatro embriones SD (38,8%) alcanzaron el estadio de blastocisto y 55 fueron rebiopsiados (52,9%). Treinta y dos de los blastocistos reanalizados resultaron ser euploides (58,2%) y se mantuvieron vitrificados para las pacientes. Hasta la fecha, 7 de estos blastocistos correspondientes a 7 pacientes han sido desvitrificados. La tasa de supervivencia y reexpansión

de los blastocistos ha sido del 100% y todos ellos se han transferido. Cuatro blastocistos implantaron obteniéndose una tasa de implantación y embarazo evolutivo del 57,1%.

Analizando los resultados en función del origen de la no obtención de diagnóstico se observó una tasa de blastocisto significativamente superior en el grupo de SD por baja confianza de los perfiles de a-CGH en comparación con el grupo de embriones SD por fallo de amplificación (61,4% vs 18,2%). No se observaron diferencias en cuanto a los resultados genéticos en función del origen de SD (68,6% perfil de baja confianza vs 42,1% no amplificación).

CONCLUSIONES:

La rebiopsia en estadio de blastocisto de embriones biopsiados en D+3 con resultado SD es una opción válida y segura que permite el rescate de embriones sin diagnóstico concluyente.

La criotransferencia de los embriones rescatados ofrece buenos resultados clínicos por lo que debería recomendarse.

La baja tasa de blastocisto de los embriones SD por fallo de amplificación parece indicar que la mala calidad embrionaria estaría afectando la calidad del ADN de los blastómeros biopsiados.

CO-035 CONTROL DE CALIDAD EN LABORATORIOS DE EMBRIOLOGÍA ANACER: ESTUDIO DE TOXICIDAD DE LOS GUANTES

E. Ferrer Robles (1), A. Carrasco Acosta (2), A. Mauri López (3), Begoña Sendón Rodríguez (4), José Luís Gómez Prieto (5), Iria Martínez Arcos (6) (1) CREA. Centro médico de Reproducción Asistida, Valencia (2) Instituto de Reproducción. CEFER, (3) PROCREAR, Reus (4) Centro Médico Pintado. Vigo, (5) AÍSA. Reproducción y Biotecnología, Zaragoza (6) IRAGA. Unidad de Reproducción Asistida La Rosaleda, Santiago de Compostela, A Coruña emparr.ferrer@creavalencia.com

INTRODUCCIÓN:

Todo material que se utiliza en los laboratorios de reproducción asistida que está directamente o indirectamente en contacto con los gametos y embriones, puede influir en ellos de forma negativa, en su viabilidad y desarrollo.

Desde la asociación ANACER se está llevando a cabo un estudio multicéntrico de toxicidad del material fungible del laboratorio, en el que se incluyen un amplio número de productos que se utilizan en los diferentes centros. De todos materiales que se están testando, presentamos los resultados preliminares de la toxicidad de los guantes.

OBJETIVOS:

Comprobar la toxicidad de los guantes que se utilizan en los laboratorios y clínicas participantes en el estudio multicéntrico de ANACER; utilizando un bioensayo, en concreto un Test de Supervivencia Espermática (con espermatozoides humanos).

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se utilizaron muestras seminales normozoospermicas, según la O.M.S. Estas se procesaron empleando material fungible embriotestado y medios de cultivo Vitrolife, G-IVF (sin albúmina) equilibrados a 6% de CO₂ y 37°C. Se capacitaron en gradientes de densidad, con posterior lavado con G-IVF. Ajustando la concentración final a 4x10⁶ espermatozoides móviles/mL. Alicuotándolo en 3 tubos embriotestados, uno para el control negativo y dos para testar por duplicado

cada material. El protocolo de testado para los guantes fue el descrito por Lierman (2007) y Nijs (2009): Se insertó una porción de guante de (0,5x 0,5 cm) dentro de cada tubo con muestra capacitada, se mantuvo a temperatura ambiente durante media hora. Se extrajo la porción de guante y se cultivó 24h en incubador a 37°C y 6% de CO₂. Tras estas 24h se valoraron las movilidades (A+B) de los cultivos. Se aceptaron los test con su control negativo con un mínimo del 70% de movilidad (A+B), que no tuvieran diferencias de toxicidad en el doble testado. Aquellos casos que no cumplieron estos requisitos se repitieron los test.

El índice utilizado para considerar la toxicidad fue:

SpST índice: % mov (A+B) test / % mov (A+B) control. Considerándose como tóxico valores <0,85.

Se realizaron 31 test para testar 20 tipos diferentes de guantes, de látex, vinilo y nitrilo, con o sin polvo.

RESULTADOS:

Se observa una toxicidad elevadísima en la totalidad de los guantes. Tal y como se observa en la tabla 1.

Indicar que el modelo de guantes de nitrilo marca Ansell Healthcare, son unos guantes que se venden como embriotestados.

CONCLUSIONES:

El uso de los guantes en el laboratorio, está indicado para la protección del embriólogo en los procesos de aspiración

folicular, transferencia embrionaria y la capacitación del semen; pero, viendo los resultados obtenidos en el estudio, no podemos obviar que los guantes podrían transferir ciertas sustancias tóxicas.

El test de supervivencia espermática, permite valorar la toxicidad de cualquier material que utilizamos en el laboratorio; esta es una técnica sencilla, sin necesidad de animales y tan sensible como el MEA, y permite detectar los niveles de toxicidad más rápidamente (24h). Si además se realiza con medios sin HSA, esto permite detectar niveles de toxicidad inferiores.

Dentro de la política de calidad todo laboratorio de embriología, se debe trabajar por el control de la seguridad de todos los procesos y productos, porque estos son esenciales para los resultados de las TRA; por ello todo nuevo producto se debería testar antes de utilizarlo y en el caso de ser tóxico, buscar una alternativa más segura.

BIBLIOGRAFÍA:

- Lierman S, DeSutter P, Dhont M, Van der Elst J. Double-quality control reveal high-level toxicity in gloves used for operator protection in assisted reproduction technology. *Fertil. Steril* 2007;88:1266-72.
- Nijs M, Franseen K, Cox A, Wissmann D, Ruis H and Ombelet W. Reprotoxicity of intrauterine insemination and in vitro fertilization-embryo transfer disposables and products: a 4-year survey. *Fertil. Steril* 2009;92:527-35.

Tabla 1: Resultados toxicidad guantes

Material guantes	Marca	Referencia	N° Test	SpST Index	Resultado
Látex sin polvo	Henry Schein	101-8787	2	0	TÓXICO
	Sempermed	822751605	4	0/0,52	TÓXICO
	Sempermed	687-823781743	2	0	TÓXICO
	Sempercure	6020314	3	0	TÓXICO
	SANYC	AQLL5	1	0,16	TÓXICO
	Naturflex	121351	1	0	TÓXICO
	Naturflex	130854	1	0	TÓXICO
	Curity	TPGHS75	1	0	TÓXICO
	AACHEN	GLN.010.10	1	0	TÓXICO
	Naturflex	130853	1	0	TÓXICO
	Naturflex	130852	1	0	TÓXICO
	MaiMed-ported PF	74187	1	0	TÓXICO
Vinilo sin polvo	Sempercure	687-825781035	2	0,61	TÓXICO
	CyberTech	9002736	1	0,36	TÓXICO
	Naturflex	124144	3	0	TÓXICO
	Naturflex	124145	1	0	TÓXICO
Vinilo con polvo	Naturflex	118528	1	0,64	TÓXICO
Nitrilo sin polvo	Microflex	NC 13621/2/3/4	1	0	TÓXICO
	Microflex	XC-310	1	0,2	TÓXICO
	Ansell healthcare / Nitrilite	93-401	2	0,71 /0,44	TÓXICO

CO-036 NUEVO SISTEMA DE ALMACENAJE DE MUESTRAS CRIOPRESERVADAS EN PAJUELA PARA PREVENIR MIX-UPS EN LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

S. Novo Bruña, R. Morató Molet
 Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona
sergi.novo@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

Aunque los mix-ups de muestras reproductivas son poco frecuentes, se han documentado varios casos en centros de reproducción asistida de todo el mundo. La correcta identificación de las muestras durante la aplicación de técnicas de reproducción asistida es primordial para reducir el riesgo de estos errores y evitar los mix-ups. Uno de los puntos críticos relacionado con la preservación de la trazabilidad es el

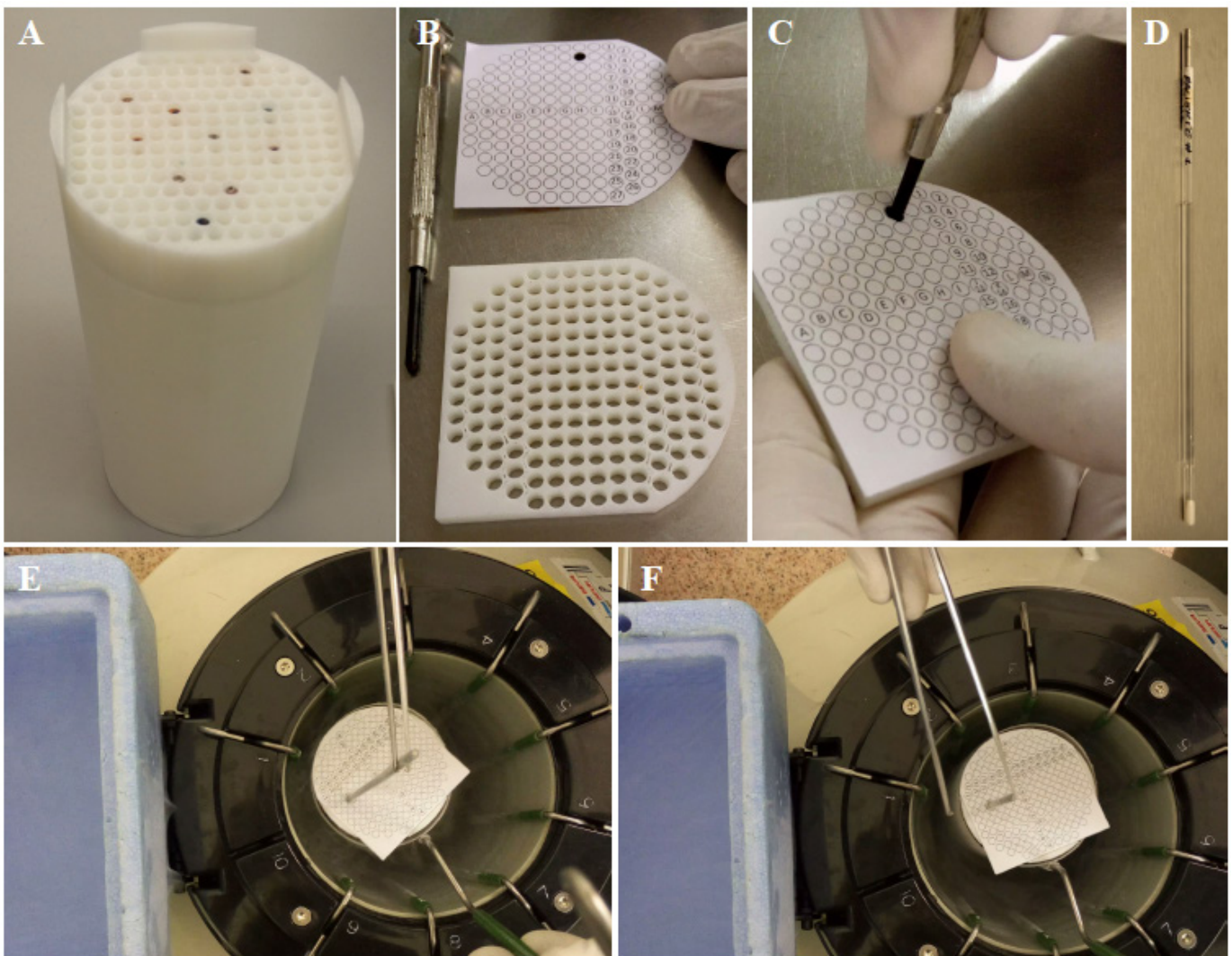
momento de almacenaje y extracción de muestras criopreservadas. Por ello hemos diseñado y prototipado un sistema de almacenaje para muestras criopreservadas en pajuelas que otorga una posición única a cada pajuela y permite preseleccionar la/s posición/es de almacenaje o extracción de muestra antes de abrir el tanque de almacenamiento y reducir así la posibilidad de error durante estas acciones.

OBJETIVOS:

Testar la aplicabilidad y efectividad de un nuevo sistema de almacenaje de muestras criopreservadas en pajuelas y analizar los posibles efectos del sistema en la calidad de muestras seminales almacenadas.

MATERIAL Y MÉTODOS:

El sistema de almacenaje desarrollado consta de dos partes, el "rack" que se



inserta en el canister (fig.A), y el “tapón de coordenadas” (fig.B) que permanece fuera del tanque.

Además, es necesario un “adhesivo de coordenadas” que permite el almacenamiento/extracción sólo de la/s posición/es preseleccionada/s gracias a su perforación (fig.C). Para el correcto funcionamiento del sistema, el sellado de las pajuelas debe incorporar unos imanes de neodimio en uno de sus extremos (fig.D). Su uso se basa en la asignación de una coordenada a cada pajuela. En el momento de almacenaje/extracción la coordenada asignada debe ser perforada en el “adhesivo de coordenadas” y pegada al “tapón de coordenadas”. Luego, se procede a abrir el tanque y se selecciona el canister adecuado que contiene el “rack” en su interior para colocar el tapón (sólo permite una posición de encaje). Si lo que se pretende es introducir una pajuela, ésta se deja caer por el orificio descubierto (fig.E). En cambio, si lo que se pretende es una extracción, simplemente acercando una pinza metálica al orificio descubierto la pajuela sube atraída y es recuperada

(fig.F). Las demás pajuelas no subirían a pesar de ser atraídas debido a que el adhesivo solo permite el paso por el orificio prefijado.

Se ha comparado la calidad espermática de la muestra almacenada (motilidad mediante CASA, viabilidad por cirtometría) y el tiempo de ejecución en las tareas de almacenaje y extracción de muestras entre el almacenaje mediante nuestro sistema con el sistema de visotubos triangulares en goblets. Para estos experimentos se utilizaron eyaculados de toro.

RESULTADOS:

Se analizaron un total de 24 pajuelas de 12 eyaculados almacenadas paralelamente en el sistema de visotubos (S1) y nuestro sistema (S2) durante al menos un mes. De cada eyaculado se descongelaron en paralelo una pajuela almacenada en cada uno de los sistemas. No se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros valorados (S1 vs S2, motilidad progresiva: $44,53 \pm 8,2\%$ vs $41,28 \pm 6,3\%$; viabilidad: $49,87 \pm 8,4\%$

vs $49,45 \pm 9,1\%$). El tiempo medio en que el tanque se mantenía abierto fue equivalente para el almacenaje de las muestras en ambos sistemas (S1: $22,9 \pm 1,3s$ vs S2: $22,6 \pm 1,2s$). Sin embargo, el tiempo medio que el tanque permanecía abierto para la extracción de muestra disminuyó significativamente al utilizar el nuevo sistema (S1: $36,4 \pm 1,1s$ vs S2: $18,6 \pm 0,6s$).

CONCLUSIONES:

A pesar de tratarse de un prototipo (de material y diseño modificables), la aplicabilidad de nuestro sistema ha sido demostrada. Este sistema es simple, seguro, eficiente y añade un nivel más de seguridad reduciendo el riesgo de mix-ups asociado a la identificación en el momento de almacenaje/extracción de muestras criopreservadas.

Actualmente estamos desarrollando un software que imprima etiquetas con la posición de almacenaje/extracción marcada.

CO-037 ESTIMACION DEL RIESGO DE ERROR Y SU CONTROL MEDIANTE SISTEMA DE RADIOFRECUENCIA EN UN LABORATORIO DE FIV

A. Obradors, M. Durban, A. Rodriguez, V. Vernaev, R. Vassena
Clínica EUGIN, Barcelona
rvassena@eugin.es

INTRODUCCIÓN:

Las instancias de error en un entorno médico se producen con una frecuencia variable dependiendo del tipo de acto (simple vs. complejo), de la costumbre que tienen los operadores al mismo (ocurrencia frecuente vs. rara), de la naturaleza del departamento (urgencias vs. actos médicos planificados), y de los sistemas de control de que dispone el equipo médico a la hora de identificar los potenciales errores. En entornos como los medicina de trasplantes de órganos, medicina transfusional, y analítica clínica, se estima que la tasa de error se sitúa entre el 0.11-0.8% de los casos, la gran mayoría de ellos debidos a fallos en la identificación del paciente o de la muestra. Hasta la fecha, no hay datos disponibles sobre la frecuencia y la naturaleza de los errores en un laboratorio de FIV. No obstante, errores de identificación en la muestra en este ámbito pueden conllevar consecuencias graves desde el punto de vista médico, social y jurídico.

OBJETIVOS:

El objetivo de este estudio retrospectivo es estimar la frecuencia de posibles errores en un laboratorio de FIV, mediante análisis de los controles automatizados de match con un sistema basado en radiofrecuencias, que se suma a los controles en doble o triple ya presentes en el laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Este estudio recopila todas las incidencias detectadas por un sistema de radiofrecuencias (Witness, RI) en 20.156 ciclos (12.09 puntos de control por ciclo) en un laboratorio de FIV. Las incidencias registradas por el sistema se clasifican en diferentes tipos: Incidencias de Proximidad (IP), es decir, el sistema detecta muestras que se han encontrado en la misma zona de trabajo (este tipo de incidencia se produce cuando se acerca una placa a una antena del sistema mientras se está moviendo para posicionarla en otra zona de trabajo). Incidencias Administrativa (IA), es decir, en la base de datos se ha introducido incorrectamente algún dato de los pacientes desde el departamento de administración, como por ejemplo, identificación del sexo de los pacientes o tipo de tratamiento. Incidencias de Riesgo (IR), es decir, la detección de muestras de parejas distintas en la misma área de trabajo sin que el operador sea consciente.

RESULTADOS:

En total se han realizado 243.801 controles automáticos, correspondientes a 20.156 ciclos, y 12.09 controles en media por ciclo. De éstos, se han detectado 1262 incidencias (0,005% de los controles, 0.06% de los ciclos). De ellas, el 96.2% (n=1214) eran IP, el 3.65% (n=46) eran IA y el 0.16% (n=2) eran IR. La tasa de riesgo

de errores, identificada por IR, fue de 2 controles de 243.801 (0.0000082% de los controles, 0.0001% de los ciclos, 1 de cada 10.000). Todas las incidencias se solucionaron mediante subsanación de los datos en el sistema administrativo, o substituyendo la muestra del paciente erróneo por el correcto.

CONCLUSIONES:

La frecuencia de riesgo de error (IR) para un laboratorio de FIV que ejecute controles en doble y triples es extremadamente baja. Aun así, existe un riesgo de error real que se sitúa en 1 de cada 10.000 ciclos. Considerando la tasa de nacido vivo media global tras IVF, esta tasa de riesgo de error conllevaría un posible nacimiento tras mismatch de muestras de 1 de cada 28.500 ciclos. La superposición de un nivel de control automatizado mediante radiofrecuencias a los controles en doble y triple ya existentes disminuye ulteriormente la tasa de riesgo de error hasta valores no detectables (0 de 20.156).

Nuestro estudio confirma la eficiencia de los mecanismos de detección de riesgo de error mediante controles en doble y triple a lo largo del proceso de IVF. El riesgo de error podría ser más alto en los laboratorios con distintos sistemas de control de muestras, organización del trabajo, cultura empresarial y training del personal.

CO-038 VALIDACIÓN DE UN SISTEMA DE TRAZABILIDAD DE EMBRIONES CRIOPRESERVADOS (STEC)

JC. Gómez Blanco (1), JB. Pagador Carrasco (1), D. García Hernández (2), B. Cobo Cuevas (3), J. Luengo Manzano (3), J. De Julián Fernández de Velasco (4), E. Delgado Niebla (4), FM. Sánchez Margallo (1), J. Mijares Grodún (1)
(1) Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, Cáceres, (2) DGH Soluciones Tecnológicas, Burgos, (3) Clínica IERA, Badajoz, (4) Clínica Norba, Cáceres
jmijares@ccmijesususon.com

INTRODUCCIÓN:

Los fallos en la identificación de material biológico (Spriggs, 2003) son muy poco frecuentes o casi improbables, debido a los exhaustivos controles de las clínicas. El correcto seguimiento del material biológico en todos los procesos del laboratorio de embriología es una actividad crucial, por lo que es necesario aumentar el control de los parámetros sobre las pajuelas sumados a los ya establecidos. Con este trabajo pretendemos aumentar la seguridad y control a través de un sistema de trazabilidad que identifique el material biológico. Como finalidad hemos establecido un seguimiento de las pajuelas que mejore nuestros controles de calidad, a la par que ofertar una mayor seguridad y tranquilidad a nuestro embriólogos en el momento de realizar una transferencia.

Para llevar a cabo la identificación de los embriones se desarrolló un sistema de trazabilidad mediante tags de radiofrecuencia (RFiD) y códigos de barras (CBR) permiten conocer el historial y la situación de nuestro material biológico.

OBJETIVOS:

Comprobar el correcto funcionamiento de los componentes seleccionados del sistema de trazabilidad (RFiD y CBR) sometidos a las condiciones de un laboratorio de reproducción asistida.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Para comprobar el comportamiento se han realizado una serie de pruebas con

el fin de poner al límite la tecnología a testear, sometiendo al sistema a diferentes situaciones que recrean las condiciones a las cuales son sometidos en el proceso de desvitrificación y vitrificación (Medida en frío MF de -195.8°C a 37°C y Medida en Caliente MC de 37°C a -195.8°C). Cada sistema está compuesto por un tag RFiD y una etiqueta de CBR. Las pruebas se realizaron en 10 unidades y consistieron en repetir el ciclo de frío y calor 50 veces (Leung et al. 2010) Para el análisis de los resultados se definieron varios conceptos fundamentales: 1) Lectura directa como aquella en la que el dispositivo se ha leído al primer o segundo intento de lectura; 2) Lectura indirecta como aquella que se ha realizado entre el segundo y quinto intento de lectura; y 3) Identificación como el hecho de que el material biológico esté identificado por el RFiD o el CBR o ambos a la vez. Todo estos datos fueron recogidos mediante un software donde se controla su trazabilidad, con la posibilidad de realizar búsquedas o inventarios, ubicación del material o recogida de los parámetros en el proceso de manipulación.

RESULTADOS:

Los resultados muestran un alto porcentaje de lecturas directas con el RFiD (MF 94,20% y MC 96,60%) y con el CBR (MF 89,00% y MC 98,00%), mientras que las lecturas indirectas tienen porcentajes más bajos: RFiD (MF 4,20% y MC 2,80%) y CBR (MF 4,20% y MC 0,80%). Por otra parte, la Identificación presenta un valor del 99,60%.

CONCLUSIONES:

Tras realizar este estudio se consiguió una supervivencia del 100% de los chips, y actualmente siguen en funcionamiento y lectura, pero después de someter al sistema a unas pruebas de resistencia bajo condiciones límites (nunca será sometidos en su normal uso en una clínica) se consiguió un prometedor grado de identificación (99,60%). Este estudio demuestra que la identificación del material biológico usando sistemas de trazabilidad (RFiD + CBR) ofrece grandes posibilidades de gestión y control en las clínicas. Nuestros resultados son preliminares y apoyan la hipótesis sobre la gran utilidad de estos sistemas. Es necesario un estudio más exhaustivo para llegar a lograr un grado de identificación del 100% y proporcionar a las clínicas un sistema de gestión total de recursos criopreservados.

BIBLIOGRAFÍA:

Spriggs M. IVF mixup: white couple have black babies. *J Med Ethics* 2003; 29:65.
Bender L. "To err is human": ART mix-ups: a labor-based, relational proposal. *J Race Gender Justice* 2006;9:443-508.

Leung AA1, Lou JJ, Mareninov S, Silver SS, Routbort MJ, Riben M, Andrechak G, Yong WH. Tolerance testing of passive radio frequency identification tags for solvent, temperature, and pressure conditions encountered in an anatomic pathology or biorepository setting. *J Pathol Inform.* 2010 Oct 1;1:21. doi: 10.4103/2153-3539.70710.



**COMUNICACIONES
P O S T E R**

P-001 EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DEL RECEPTOR MAS1 DE LA ANGIOTENSINA 1-7 EN LOS ESPERMATOZOIDES HUMANOS

A. Valdivia Palacín (1), L. Totorikaguena Iturriaga (2), N. Agirregoitia Marcos (2), L. Cortés Meler (2), B. Corcostegui Ormazabal (3), M. Beitia San Vicente (3), E. Agirregoitia Marcos (3)

(1) Departamento de Biología Celular e Histología, Facultad de Farmacia, UPV/EHU, Vitoria-Gasteiz, Alava (2) Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina y Odontología, UPV/EHU, (3) Laboratorio de Andrología, Unidad de Reproducción Humana, Hospital Universitario de Cruces-Barakaldo (OSAKIDETZA)

asier.valdivia@ehu.es

INTRODUCCIÓN:

El Sistema Renina Angiotensina (SRA) ha sido tradicionalmente descrito como un sistema hormonal circulante que regula la homeostasis cardiocirculatoria y renal. Está compuesto por un conjunto de péptidos bioactivos, denominados genéricamente angiotensinas, que se unen a receptores de membrana específicos. El principal péptido bioactivo del sistema es la angiotensina II, que se une preferentemente al receptor AT1. El receptor MAS1, acoplado a proteínas G, que se descubrió de manera más reciente, se une de manera específica a la Angiotensina 1-7 produciendo efectos fisiológicos contrarios a los inducidos por el eje Angiotensina II-AT1 en diferentes tejidos y procesos. Existen cada vez más estudios que relacionan el SRA con la regulación de procesos fisiológicos locales (proliferación celular, angiogénesis). En relación a la fertilidad humana, es conocida la presencia del receptor AT1 en la membrana de los espermatozoides y la presencia de la Angiotensina II en el plasma seminal, reconociéndosele a ésta, una función estimuladora de la motilidad y la capacitación espermática en la mayoría de los estudios realizados. El receptor MAS1 de la Angiotensina 1-7 no ha sido descrito aún en los espermatozoides, pero sí en el testículo de ratón, atribuyéndosele funciones en la regulación de la espermatogénesis.

OBJETIVOS:

En este trabajo, se pretende describir por primera vez la presencia del receptor MAS1 en los espermatozoides humanos, así como su RNAm.

MATERIAL Y MÉTODOS:

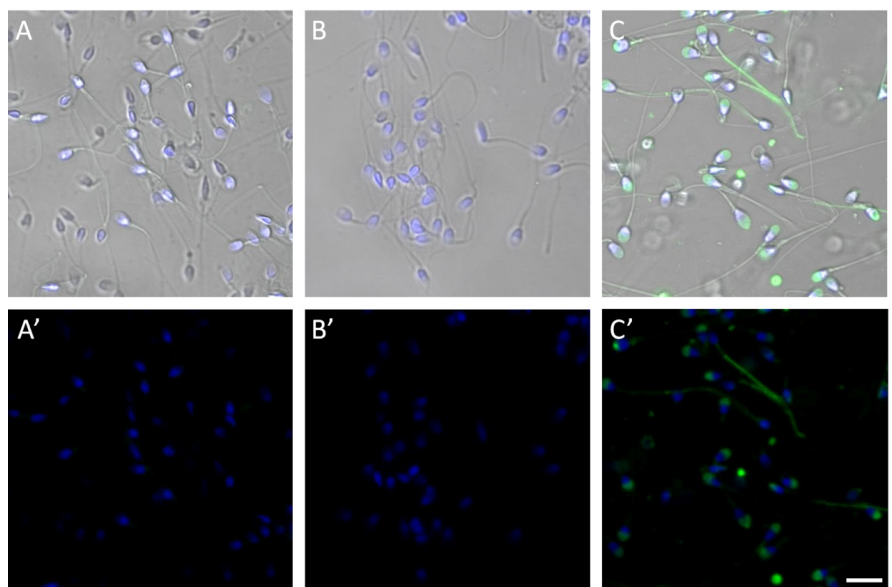
Este estudio se llevó a cabo en muestras seminales de pacientes que acudían por primera vez a la Unidad de Reproducción Humana del Hospital de Cruces. Se recuperaron los espermatozoides de la muestra en cruda mediante centrifugación y se resuspendieron en un medio controlado. En el caso de los ensayos de RT-PCR, se recuperaron únicamente los espermatozoides de mejor movilidad mediante swim-up, para evitar la contaminación de RNAm de otros tipos celulares. La detección y localización del receptor MAS1 en los espermatozoides humanos fue realizado mediante ensayos de Western Blot e inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal, usando anticuerpos primarios monoclonales y realizando un control de especificidad mediante preincubación con el péptido bloqueante. La presencia del RNAm del receptor MAS1 fue determinada mediante ensayos de RT-PCR.

RESULTADOS:

Los resultados de Western Blot permiten observar una banda de tinción específica en el rango de peso molecular esperado (37-50Kda), coincidente con el del receptor MAS1. A su vez, los ensayos de inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal, revelan una localización en la zona apical de la cabeza del espermatozoide, confirmándose la especificidad de la señal fluorescente mediante las imágenes obtenidas en al preincubar el anticuerpo primario con su péptido bloqueante (donde desaparece la señal). La RT-PCR demuestra la presencia del transcrito del gen del receptor MAS1 en los espermatozoides humanos.

CONCLUSIONES:

El receptor MAS1 se haya expresado en los espermatozoides humanos, y presenta una localización zonal específica en la cabeza del espermatozoide. la presencia



de su RNAm refuerza los datos obtenidos mediante la inmunodetección. Serán necesarios estudios funcionales para determinar el efecto fisiológico de la estimulación de este receptor en los espermatozoides.

BIBLIOGRAFÍA:

- Santos RAS, AJ Ferreira, AC Simoes e Silva..
Exp. Physiol. 2008, 93: 519-527.

- Leal MC, Pinheiro SV, Ferreira AJ, Santos RA, Bordoni LS, Alenina N, Bader M, França

LR.. 2009. J Anat. May;214(5):736-43.

- Vinson GP, Mehta J, Evans S, Matthews S, Puddefoot JR, Saridogan E, Holt WV, Djahanbakhch O. 1996. Regul Pept. Dec 3;67(2):131-

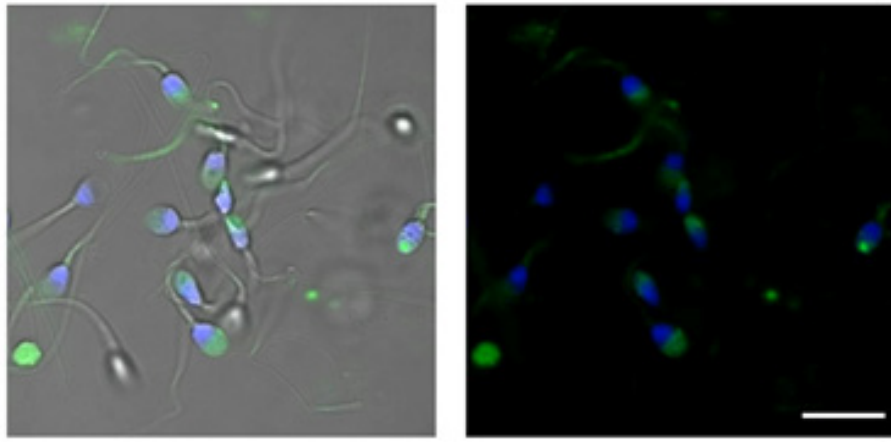


Figura 1. Inmunolocalización del receptor Mas (verde) y marcaje del DNA (azul) en espermatozoides humanos. En la fila de abajo (A', B', C') se excluye la imagen de luz transmitida. A) Control negativo 1: incubación con el péptido bloqueante y el anticuerpo para Más. B) Control negativo 2: incubación sin anticuerpo primario. C) Incubación con el anticuerpo para Más. n= 5. Imágenes representativas. Barra de escala: 10 μm

P-003 PLURIPOTENCIALIDAD DE LAS CÉLULAS DE LA GRANULOSA LUTEINIZADA DEL OVARIO HUMANO. ESTRATEGIAS REGENERATIVAS EN MEDICINA REPRODUCTIVA

R. Gómez Casaseca (1), S. García Cano (2), ME. Fernández Santos (3), F. Pérez Milán (3)

(1) Unilabs Reproducción Humana, Madrid. (2) Instituto Europeo de Fertilidad, Madrid. (3) Hospital Gregorio Marañón, Madrid

r.gomez.casaseca@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

En diversos estudios se ha demostrado la multipotencialidad de las células de la granulosa luteinizadas (CGL) obtenidas a partir de líquido folicular (1). Se han observado similitudes con la caracterización y el comportamiento de las Células Progenitoras Pluripotentes de origen Mesenquimal (CSM), procedentes de otros tejidos.

Las CSM, son células adultas multipotentes capaces de autorrenovarse, proliferar y diferenciarse a tejidos diferentes de su origen. La Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) propone unos

criterios para la caracterización "in vitro" de estas células: 1) Demostrar el aislamiento de células adherentes con morfología fibroblastoide 2) Determinar la expresión de los antígenos CD105, CD73 y CD90, y ausencia de marcadores hematopoyéticos CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 o CD19 y HLA-DR 3) Inducir su diferenciación "in vitro" a líneas osteoblástica, adipoblástica y condroblástica (2).

OBJETIVOS:

Identificar y caracterizar la población de CGL que muestran marcadores inmunofenotípicos y capacidades de diferenciación propias de CSM.

MATERIAL Y MÉTODOS:

1. Material.

1.1 Obtención.

Las CGL han sido obtenidas por aspiración transvaginal de siete pacientes sometidas a un tratamiento de FIV.

2. Métodos

2.1. Procesado de las muestras

El líquido folicular se centrifuga mediante gradiente discontinuo de Ficoll para recuperar las CGL.

2.2.Cultivo Celular.

Las células se plantan a una concentración de 160000 células / cm² en DMEM completo + LIF. La morfología celular se evalúa mediante microscopía invertida.

2.3.Diferenciación in-vitro.

Para la diferenciación a los linajes osteoblástico, adipoblástico y condroblástico, se usaron medios de inducción de la diferenciación característicos para cada linaje.

2.4.Citometría de flujo.

Determinación de la expresión de marcadores asociados a CSM.

RESULTADOS:

De las siete muestras procesadas se obtienen células con morfología mesenquimal en seis de ellas.

Caracterización celular por Citometría de Flujo.

Se determinó la expresión de marcadores asociados a CSM en CGL que presentaban pocos días de cultivo (una media de 12) y en CGL que presentaban un cultivo más prolongado (una media de 37 días).

Al hacer un análisis por tamaño (FSC) y complejidad (SSC), se observa una mayor heterogeneidad, una población celular más dispersa, en la primera muestra.

La expresión de HLA-DR (Antígeno de histocompatibilidad) está presente en muestras con pocos días de cultivo; pero a medida que el cultivo avanza se va perdiendo, llegando a ser negativo, tal como ocurre con las CSM.

Las células que tienen más días de cultivo, presentan marcadores similares a los que expresan las CSM de médula ósea y de grasa, recomendados por la ISCT, siendo positivos para CD90, CD73, CD105 y negativos para CD117, CD34, CD45, CD19 y HLA-DR. Además se ha ampliado la dotación de marcadores para una mejor caracterización celular, añadiendo como marcadores positivos CD71, CD271 y negativos CD14, CD133, C31. La expresión de estos marcadores en células con pocos días de cultivo es menor.

Diferenciación Celular.

Tras inducir diferenciación osteogénica, condrogénica, y adipogénica en tres muestras de las siete procesadas, se consiguió la diferenciación osteogénica y condrogénica en las tres y diferenciación adipogénica en dos de ellas.

CONCLUSIONES:

Los resultados obtenidos forman parte de la fase de evaluación de factibilidad de un estudio más amplio.

1. Es posible obtener, expandir y diferenciar a partir de CGL células de estirpe mesenquimal.

2. Quedan estandarizadas las condiciones de cultivo y los procesos de diferenciación de las CGL expandidas.

3. Las células CGL expandidas expresan los mismos marcadores que las CSM procedentes de otros tejidos.

4. El líquido folicular obtenido de ovarios estimulados parece ser una nueva fuente celular con características de CSM, útil en futuras aplicaciones en terapia celular y medicina regenerativa.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Kossowska-Tomaszczuk. The Multipotency of Luteinizing Granulosa Cells Collected from Mature Ovarian Follicles. *Stem Cells*. 2009;27:210-9.

2. Brinchmann JE. Expanding autologous multipotent mesenchymal bone marrow stromal cells. *Journal of the Neurological Sciences*. 2008;265(1-2):127-30.

P-004 IMPLEMENTACIÓN DE UN NUEVO TEST GENÉTICO PARA EL CRIBADO AMPLIADO DE PORTADORES DE ENFERMEDADES GENÉTICAS RECESIVAS EN UN PROGRAMA DE DONACIÓN DE OVOCITOS

A. Abulí Vidal (1), L. Latre Navarro (2), M. Boada Pala (2), E. Clua Obrado (2), B. Rodríguez Santiago (3), L. Armengol Dulcet (3), B. Coroleu Lletget (3), P. Barri Ragué (3), A. Veiga Lluch (3), X. Estivill Pallejà(1)

(1) Unidad de Medicina Genómica Personalizada, Departamento de Obstetricia, Ginecología y Reproducción, Hospital Universitario Quirón-Dexeus, (2) Servicio de Medicina de la Reproducción, Departamento de Obstetricia, Ginecología y Reproducción, Hospital Universitario Quirón-Dexeus, (3) qGenomics, Departamento I&D, Barcelona.

annabu@dexeus.com

INTRODUCCIÓN:

El cribado actual de portadores de enfermedades genéticas en donantes de ovocitos incluye la evaluación del riesgo de transmisión de enfermedades hereditarias a partir de los antecedentes

personales y familiares. La mayoría de los centros de reproducción asistida, basándose en las recomendaciones de las diversas sociedades científicas, incluyen también el cariotipo, el cribado mutacional dirigido del gen CFTR y el estudio de la premutación X-Frágil. La

aparición de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva (Next Generation Sequencing, NGS) y el creciente abaratamiento de éstas, ha permitido ampliar el cribado genético para un elevado número de enfermedades con un coste económico razonable. Este

hecho ha motivado la incorporación de esta tecnología y el desarrollo de un test ampliado de portadores (test qCarrier) en nuestro programa de donación de ovocitos (DO) con el fin de reducir el riesgo de transmisión de enfermedades genéticas hereditarias en la descendencia.

OBJETIVOS:

1. Desarrollar un nuevo test genético basado en tecnología de NGS para el cribado ampliado de mutaciones recesivas en el ámbito de la medicina reproductiva.

2. Implementación del test de cribado de portadores en nuestro programa de DO.

MATERIAL Y MÉTODOS:

La prueba cubre 200 genes (68 en análisis completo de secuencia y 132 con cribado dirigido de mutaciones conocidas) asociados a 185 enfermedades autosómicas recesivas y 11 ligadas al cromosoma X, incluyendo enfermedades prevalentes en el área mediterránea. El test ha sido desarrollado mediante tecnología de NGS y permite la caracterización de un amplio espectro de mutaciones (puntuales, inserciones, deleciones, variantes de número de copia y

reordenamientos). El cribado ampliado de portadores se realiza a todas las candidatas a donante y a la pareja masculina de las receptoras de ovocitos. Se descartan del programa todas las candidatas a donante de ovocitos portadoras de una enfermedad ligada al cromosoma X. El estado de portador heterocigoto para una enfermedad autosómica recesiva no es motivo de exclusión como donante, pero implica la selección de una receptora cuya pareja masculina no sea portadora de la misma enfermedad.

RESULTADOS:

La validación de la prueba mostró una elevada sensibilidad (>99%) permitiendo detectar 29 SNVs, 13 indels y 25 CNVs en el set de validación. Se ha efectuado el cribado ampliado de portadores a un total de 293 candidatas a donantes de ovocitos y un total de 396 parejas de receptoras. La implementación del test en nuestro programa de DO ha permitido identificar un 42% de pacientes/donantes portadores de al menos una mutación causante de enfermedades de herencia Mendeliana, como la fibrosis quística, la enfermedad de Gaucher, la poliquistosis renal autosómica recesiva y la atrofia muscular espinal, entre otras. Se han descartado del programa de DO 6 candidatas

portadoras de enfermedades ligadas al cromosoma X, como la hemofilia A, la premutación X-Frágil y la distrofia muscular de Duchenne. Por último, se han identificado 18 asignaciones con potencial riesgo reproductivo que han requerido la asignación de una nueva donante distinta a la preasignada.

CONCLUSIONES:

- La incorporación de las tecnologías de NGS incrementa la tasa de detección de portadores de enfermedades potencialmente transmisibles a la descendencia.

- El cribado ampliado de portadores constituye una herramienta útil para reducir el riesgo de transmisión de enfermedades genéticas hereditarias en los niños nacidos a través de DO.

- La implementación de esta prueba en el ámbito clínico requiere de asesoramiento genético pre y post-test que garantice la información adecuada, el consentimiento de los pacientes, la interpretación de la patogenicidad de las variantes halladas, así como salvaguardar los aspectos éticos fundamentales de cara a pacientes y donantes de ovocitos.

P-005 EFICACIA DEL SCREENING CROMÓSOMICO COMPLETO (CCS) EN D+5 PARA MEJORAR EL ÉXITO DE LOS CICLOS FIV EN RECEPTORAS CON FALLOS DE IMPLANTACIÓN (RIF) Y ABORTOS DE REPETICIÓN (RPL).

B. Lledo Bosch(1), R. Morales Sabater(1), JA. Ortiz Salcedo(1), H. Blanca Ordoñez(1), J. Guerrero Villena(2), J. Ten Morro(2), J. Llacer Aparicio(2), R. Bernabéu Pérez(2)
(1) INSTITUTO BERNABEU BIOTECH, Alicante. (2) INSTITUTO BERNABEU, Alicante
blledo@institutobernabeu.com

INTRODUCCIÓN:

Las aneuploidías embrionarias son la principal causa de las bajas tasas de éxito en pacientes con RPL y RIF. El desarrollo de la técnica de CCS ha

proporcionado valiosa información acerca de la dotación cromosómica de los embriones. Y empleada como método de selección embrionaria permitiría mejorar las tasas de niño nacido en ciclos de FIV, así mismo en pacientes

RPL conseguiría disminuir las tasas de aborto y en paciente RIF incrementar las tasas de implantación.

OBJETIVOS:

El objetivo del presente trabajo fue determinar si el empleo del CCS en pacientes receptoras de ovocitos que sufren RIF y RPL incrementa las tasas de embarazo y de implantación y disminuye la tasa de aborto.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se ha llevado a cabo un estudio retrospectivo, en el que se han incluido los resultados de array-CGH de 312 embriones (221 RIF y RPL y 101 controles) de 60 ciclos de donación de pacientes RIF y RPL y 31 pacientes receptoras controles llevados a cabo en nuestras clínicas de fertilidad de Enero de 2013 a Diciembre de 2014. También se incluye un grupo de pacientes receptoras de ovocitos (n=50) que sufren RIF y RPL en los que no se ha empleado CCS. RIF se definió como pacientes con beta negativa tras la transferencia de al menos 4 embriones de buena calidad y RPL como dos o más abortos. Las biopsias embrionarias se

realizaron en D+5. El análisis de array-CGH de los trofoectodermos biopsiados se llevaron a cabo empleando el array SurePrintG3-8x60K.

RESULTADOS:

Se obtuvo resultado del CCS en D+5 en el 99.5% de los embriones biopsiados (310/312). La media de embriones biopsiados por ciclo donado fue de 3.4. La tasa global de beta positiva fue de 58.5% y la tasa de implantación global del 43.5%. La tasa de aborto fue del 10%. La tasa de aneuploidías en embriones de receptoras en D+5 fue del 30.1% y en la mayoría de los casos (70%) la aneuploidía afectó a un solo cromosoma. La tasa de aneuploidías mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo RIF y RPL (26.3% vs 34.5%, $p<0.05$). Tras el empleo de CCS para la selección de embriones euploides no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de implantación en pacientes RIF y RPL y pacientes controles (41.3%

vs 47.1%, $p=0.578$). Por otro lado, si comparamos la tasa de implantación de los pacientes con RIF y RPL en los que se empleó CCS frente al grupo de pacientes RIF y RPL en los que no se ha empleado CCS se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. (41.3% vs 25%, $p<0.05$).

CONCLUSIONES:

Nuestros resultados revelan una alta tasa de aneuploidías en pacientes receptoras de ovocitos que sufren RIF y RPL frente a pacientes sin dicha patología. El empleo del CCS en D+5 como método de selección embrionaria para seleccionar embriones euploides es una herramienta prometedora ya que permite mejorar el éxito de los tratamientos en pacientes que sufren RIF y RPL. Así mismo, la transferencia de un único embrión nos permitirá disminuir la tasa de embarazo múltiple sin disminuir la tasa de niño en casa.

P-006 GESTACIÓN A TÉRMINO TRAS INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN OVEJAS SOMETIDAS A TRASPLANTES DE ÚTERO

E. Matilla Pinto (1), J. Mijares Gordún (1), N. Hernández Rollán (1), B. Moreno Naranjo (1), E. Abellán Rubio (1), MC. Calles Vázquez (1), JA. Domínguez Arrollo (2), IS. Álvarez Miguel (2), FM. Sánchez Margallo (1)

(1) Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, Cáceres, (2) Clínica IERA, Badajoz

jmijares@ccmijesususon.com

INTRODUCCIÓN:

En el Centro de Cirugía de Mínima Invasión de Cáceres (CCMIJU) llevamos a cabo un proyecto de autotrasplantes uterinos en modelo ovino con el propósito de avanzar en el objetivo del trasplante de útero humano en nuestro país. La futura gestación en estas ovejas depende de la correcta realización de la intervención y que consecuentemente el útero recupere su funcionalidad. Por lo tanto hay que verificar que la gestación en estas ovejas con el útero trasplantado mediante la realización de técnicas de reproducción.

Las ovejas son animales estacionales, pero la inducción del celo fuera de la época reproductiva puede realizarse mediante tratamiento hormonal exógeno. Se consigue gracias a unas esponjas de progesterona colocadas vía vaginal, que simulan el mismo efecto que ejerce el cuerpo lúteo (CL) suprimiendo la liberación de la gonadotropinas hipofisarias (1). Tras la retirada de las esponjas, la hipófisis desencadena un aumento de liberación de gonadotropinas que permite el aumento de la frecuencia y amplitud de los pulsos de hormona luteinizante (LH) y el crecimiento de un folículo dominante.

OBJETIVOS:

El objetivo del estudio es conseguir la gestación en ovejas tras realizar un autotrasplante de útero mediante la realización de inseminaciones.

MATERIAL Y MÉTODOS:

El estudio se desarrolló en ovejas de raza Merina de fertilidad probada de 2-3 años de edad y en torno a 50 kg de peso. Al tercer mes después de la cirugía, los animales se sometieron a estimulación hormonal. La administración de la progesterona se realizó mediante esponjas intravaginales de acetato

de flugestona durante 14 días. El día de la retirada de la esponja, a cada animal se le administró 450 UI de PMSG (gonadotropina de suero de hembra gestante) intermuscular para desencadenar la ovulación. La inseminación se realizó 55 horas después de la inyección de PMSG con semen fresco. Con la oveja sostenida sobre los miembros delanteros y con la ayuda de un espéculo vaginal se dirigió la vaina de inseminación hacia el cérvix depositando el semen en los primeros pliegues cervicales. El eyaculado fue recogido de carneros Merino Fleischaf de fertilidad probada del Centro de Selección y Reproducción Animal de Badajoz (CENSYRA). El diagnóstico de gestación se realizó entre los 35-40 días tras las inseminaciones.

RESULTADOS:

Se realizaron 7 estimulaciones e inseminaciones a tiempo fijo en las ovejas sometidos al trasplante de útero. 4 de estos animales quedaron gestantes resultando una de las gestaciones gemelar, con lo que nos proporciona un 57% de éxito de gestación. Hasta el momento se ha producido un nacimiento por cesárea que no ha presentado complicaciones y con una evolución satisfactoria.

CONCLUSIONES:

La gestación completa después de la inseminación en ovejas sometidas a autotrasplante de útero ha sido conseguida con éxito en nuestro centro.

El éxito de la técnica de inseminación, incluyendo el tratamiento con progestágenos, confirma un restablecimiento del flujo sanguíneo después de la operación, recuperándose la funcionalidad del ovario para la foliculogénesis y luteolisis. También queda confirmada la funcionalidad del útero trasplantado por la obtención, mantenimiento y finalización de la gestación.

BIBLIOGRAFÍA:

1.- Smith JF, Robinson TJ. The effect of exogenous progestagen on the levels of free oestrogen in the ovarian vein plasma of the ewe. *J Endocrinol.* 1970 Dec;48(4):485-96.

P-007 ESTUDIO DEL POTENCIAL IMPLANTATORIO DE EMBRIONES EUPLOIDES SEGÚN SU VALORACIÓN MORFOCINÉTICA

M. Florensa Bargalló(1), A. Capalbo(2), M. Meseguer(3), FM. Ubaldi(3), J. Herreros(1), M. Stoppa(3), M. Esbert(1), L. Rienzi(3)
(1)IVI Barcelona, (2) GÉNERA, Centres for Reproductive Medicine, (3) IVI Valencia
mflorensa@ivi.es

INTRODUCCIÓN:

La tecnología time lapse ha permitido mejorar la selección embrionaria revelando una serie de parámetros morfocinéticos claves a la hora de escoger el embrión con mayor poder implantatorio (Meseguer et al., 2012). En ciclos con diagnóstico genético preimplantacional (DGP) donde, tras el análisis genético se transfieren embriones euploides, la selección adicional de embriones según parámetros morfocinéticos puede aumentar la tasa de implantación por transferencia.

OBJETIVOS:

El objetivo de este estudio es identificar los parámetros morfocinéticos de embriones euploides con implantación conocida y proponer un algoritmo para su selección.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se realizó un estudio retrospectivo observacional analizando el desarrollo de 342 embriones euploides transferidos en 265 ciclos de DGP cultivados en un incubador que incorporaba tecnología time-lapse (EmbryoScope®, Vitrolife, Dinamarca). Para definir el comportamiento morfocinético se obtuvieron datos de embriones KID (Known Implantation Data), es decir, embriones transferidos en ciclos con 100% de implantación (el número de embriones transferidos corresponde con el número de sacos gestacionales; n=130) o con 0% de implantación (n=169). Se registraron los tiempos de división celular embrionaria en horas post-ICSI y se calculó la duración del ciclo celular así como la sincronía de las divisiones celulares. Adicionalmente, se anotó el tiempo de compactación (tM), de formación de blastocisto (tB) y de expansión de éste (tEB). El análisis cromosómico se realizó mediante CGH y qPCR.

RESULTADOS:

Con los datos recogidos se obtuvo una regresión logística que identificó tM (<94.3h) seguido de s2 (<1.25h) como las variables mejor relacionadas con la implantación. A partir de estos resultados se construyó un modelo jerárquico que permitió clasificar los embriones euploides en 4 grupos (grupo A a D) según su potencial implantatorio. De esta manera se encontraron diferencias significativas (p<0.05) entre las tasas de implantación de los grupos A (58.0%), B (43.9%), C (31.8%) y D (25.0%).

CONCLUSIONES:

El presente estudio supone el análisis de parámetros morfocinéticos de embriones euploides más amplio realizado hasta la fecha. Este análisis revela diferencias significativas en la morfocinética de embriones euploides que implantan respecto de embriones

euploides que no implantan. El modelo propuesto sería aplicable para la selección de embriones de ciclos de DPI cultivados en incubadores con time-lapse y, tras su validación prospectiva, podría suponer una herramienta

predictiva de implantación embrionaria.

BIBLIOGRAFÍA:

Meseguer M, Rubio I, Cruz M, Basile N, Marcos J, Requena A. Embryo incubation

and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertil Steril* 2012; 98(6):1481-9

P-008 ESTIMA DEL RIESGO GENETICO DE UNA MUESTRA ESPERMÁTICA: VALORES DE ANEUPLOIDIA EN LA POBLACION FERTIL

E. Garcia Mengual (1), J.C. Trivino Pardo (1), J.J. Bataller Sanchez (2), C. Sanchez Matamoros (1), A.Saez Cuevas (1), A. Barbera Alberola (2), M. Ruiz Jorro (2), X. Vendrell Monton (1)
(1) Sistemas Genomicos. Paterna, Valencia, (2) CREA - Valencia. Departamento de Andrología. Valencia.
elena.garcia@sistemasgenomicos.com

INTRODUCCIÓN:

Durante la última década, el estudio de la aneuploidía espermática mediante hibridación in situ fluorescente (FISH) ha cobrado más relevancia en la valoración del varón infértil, proporcionando un valor pronóstico sobre la aneuploidía embrionaria. Es lógico pensar que el riesgo de generar un embrión aneuploide aumenta con la frecuencia de espermatozoides aneuploides en el eyaculado. No obstante, no está bien establecido cómo estimar el riesgo de una muestra espermática. La bibliografía es amplia, sin embargo, la diversidad de protocolos utilizados, de cromosomas estudiados, el número de espermatozoides analizados así como las limitaciones técnicas para valorar la nulisomía, complican la comparación entre estudios y, por lo tanto, la posibilidad de llegar a un consenso sobre los valores de referencia de la población control.

OBJETIVOS:

En este estudio, nos planteamos el análisis estadístico de los resultados de FISH en espermatozoides de donantes de semen, como representación de la población fértil control. El objetivo fue establecer un modelo de frecuencia de aneuploidía basal, con una significación estadística del 99,9%.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Valoración de la frecuencia de la aneuploidía (nulisomía y disomía) por cromosoma y de la diploidía por pareja de cromosomas, en una población fértil control. Se estudiaron 9 cromosomas (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X e Y), se valoraron hasta 4000 espermatozoides por ronda de hibridación y se informó de la frecuencia de nulisomía mediante un sistema automatizado de captura de señales en núcleos espermáticos únicos. Población estudiada: once varones caucásicos normozoospermicos (criterios OMS-V) con fertilidad probada, valoración andrológica clínica completa y normal, serología normal, cariotipo normal, no fumadores y no expuestos a mutágenos. Procesado de la muestra: lavado, permeabilización, fijación, extensión y FISH con sondas centroméricas para los cromosomas 15, 16, 17, (Vysis®) 18, X, Y (Metasystems®) y sondas locus específicas para 13, 21 (Metasystems®) y 22 (Vysis®) en 4 rondas de hibridación: 13/21, 15/17, 16/22 y 18/X/Y. Análisis de las señales de hibridación mediante un sistema fluorescente automatizado basado en la digitalización de imágenes (Metafer-MetaCyte® de MetaSystems®). A partir de las frecuencias de nulisomía, disomía, y diploidía observadas, se establecieron unos valores de referencia específicos para cada anomalía y cromosoma, mediante el test no paramétrico de inferencia estadística Wilcoxon Rank

Sum con un nivel de confianza del 99,9% ($\alpha \leq 0,01$).

RESULTADOS:

Se estudiaron un total de 144.639 espermatozoides, una media de 13.149 por muestra. Los resultados indican diferentes susceptibilidades a la aneuploidía para cada cromosoma y tipo de alteración estudiados. Los límites superiores de las frecuencias medias de alteración por cromosoma con un nivel de confianza superior al 99,9% ($\leq 0,01$) fueron los siguientes: i) Nulisomía para los cromosomas: 13 (1,6%); 15 (1,0%); 16 (2,6%); 17 (1,2%); 18 (1,0%); 21 (0,5%); 22 (3,1%); X/Y (1,7%); ii) Disomía para los cromosomas: 13 (0,5%); 15 (1,5%); 16 (1,1%); 17 (0,4%); 18 (0,5%); 21 (0,5%); 22 (0,9%); X/Y (0,7%); iii) Diploidía para las parejas de cromosomas: 13/21 (1,8%); 15/17 (0,8%); 16/22 (1,0%); 18/X/Y (1,2%).

CONCLUSIONES:

El análisis estadístico de la aneuploidía en la población fértil control permite establecer un modelo de distribución de la aneuploidía por cromosoma y tipo de alteración para a su vez determinar si las frecuencias de aneuploidía de un probando se encuentran, o no, dentro de la norma, con un nivel de confianza del 99,9%.

P-010 LA UTILIZACIÓN DE SELECCIÓN CELULAR INMUNOMAGNÉTICA (MACS) OFRECE RESULTADOS OBSTÉTRICOS Y PERINATALES SIMILARES A LOS OBTENIDOS MEDIANTE LA PREPARACIÓN ESTÁNDAR. ENSAYO PROSPECTIVO, ALEATORIZADO EN EL PROGRAMA DE OVODONACIÓN.

Damià Castelló Salom, L Romany Sevilla, N Garrido Puchalt, A Cobo Cabal, M Muñoz Cantero, M Meseguer Escrivá
Instituto Universitario IVI, Valencia
damia.castello@ivi.es

INTRODUCCIÓN:

Una de las tecnologías disponibles para la selección espermática es la clasificación celular inmunomagnética (MACS), utilizada también en otros ámbitos como el aislamiento de células progenitoras raras de sangre de cordón umbilical o su uso en sangre periférica para sustituir a la médula ósea en el trasplante de pacientes tras quimioterapia o radioterapia. En el caso de la selección de espermatozoides basado en aspectos moleculares, es imprescindible que haya sido descrita la relación de estos marcadores de membrana con la infertilidad masculina. Un ejemplo de esto sería la externalización de la fosfatidilserina (PS), que se produce en los procesos de apoptosis. La Anexina V (AV) tiene elevada afinidad por la PS, y conjugada con los microbeads (MB) se pueden unir magnéticamente a los espermatozoides con la membrana comprometida identificando los espermatozoides apoptóticos, pues quedarán retenidos en las columnas siendo la fracción AV positiva, mientras que los espermatozoides que no estén unidos a las partículas paramagnéticas, fracción AV negativa fluirán a través de la columna y serán los candidatos a ser utilizados como óptimos.

OBJETIVOS:

Mediante la selección aleatoria de pacientes masculinos dentro del programa de donación de ovocitos, determinar si el uso de la técnica MACS ofrece algún efecto sobre los nacidos

vivos nacidos tras ICSI al compararlo con la preparación seminal estándar.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se han establecido dos grupos de estudio analizando los recién nacidos vivos de ciclos con ICSI usando MACS como método de selección espermática (60 partos) y grupo control consistente en niños nacidos de ciclos también de ICSI aplicando la técnica swim-up de selección espermática (64 partos). Un total de 65 y 66 recién nacidos del grupo MACS y grupo control respectivamente fueron descritos en este estudio unicéntrico, prospectivo, aleatorizado y triple ciego. El estudio se llevó a cabo desde octubre del 2010 a Enero del 2013 en la clínica IVI Valencia.

RESULTADOS:

No se han encontrado beneficios clínicos ni efectos adversos sobre los resultados obstétricos y perinatales tras la aplicación de la tecnología MACS una vez analizados los posibles factores de confusión. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en cuanto a ruptura prematura de membranas 6.1% (CI 95% 0-12.8) vs 5.9% (CI 95% 0-12.4), sangrados en el primer trimestre 28.6% (CI 95% 15.9-41.2) vs. 23.5% (CI 95% 11.9-35.1), procedimientos invasivos como amniocentesis 2.0% (CI 95% 0-5.9) vs. 3.9% (CI 95% 0-9.2), diabetes 14.3% (CI 95% 4.5-24.1) vs. 9.8% (CI 95% 1.6%-17.9), anemia 6.1% (CI 95% 0-12.8) vs. 5.9% (CI 95% 0-12.4), sangrado del 2º y 3er

trimestre 10.2% (CI 95% 1.7-18.7) vs. 5.9% (CI 95% 0-12.4), infección del tracto urinario 8.2% (CI 95% 0.5-15.9) vs. 3.9% (CI 95% 0-9.2), hipertensión inducida por el embarazo 6.1% (CI 95% 0-12.8) vs. 15.7% (CI 95% 5.7-25.7), peso del recién nacido (g) 2684.10 (CI 95% 2499.48-2868.72) vs. 2676.12 (CI 95% 2499.02-2852.21), tamaño neonatal (cm) 48.3 (CI 95% 47.1-49.4) vs. 46.5 (CI 95% 44.6-48.4), colestasia gestacional 0% (CI 95% 0-0) vs. 3.9% (CI 95% 0-9.2) respectivamente en el grupo MACS comparado con el grupo control.

CONCLUSIONES:

Nuestros datos sugieren que según el ensayo controlado aleatorizado realizado, la aplicación de la tecnología MACS no incrementa ni disminuye las patologías obstétricas en la madre, ni las perinatales en niños concebidos con su uso.

BIBLIOGRAFÍA:

Cayli S, Sakkas D, Vigue L, Demir R, Huszar G. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl-XL levels in mature and diminished maturity sperm. *Mol Hum Reprod* 2004;10:365-72.

Dirican EK, Ozgun OD, Akarsu S, Akin KO, Ercan O, Ugurlu M, et al. Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet* 2008;25:375-81.

Garrido N, Remohi J, Martinez-Conejero JA, Garcia-Herrero S, Pellicer A, Meseguer M. Contribution of sperm molecular features to embryo quality and assisted reproduction success. *Reprod Biomed Online* 2008;17: 855-65.

Grunewald S, Reinhardt M, Blumenauer V, Said TM, Agarwal A, Abu Hmeidan F, et al. Increased sperm chromatin decondensation in selected nonapoptotic spermatozoa of patients with male infertility. *Fertil Steril* 2009;92:572-7.

Makker K, Agarwal A, Sharma RK. Magnetic activated cell sorting (MACS): utility in assisted reproduction. *Indian J Exp Biol* 2008;46:491-7. 8 VOL.

Paasch U, Grunewald S, Glander HJ.

Sperm selection in assisted reproductive techniques. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007;65:515-25.

Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340:17-8. 2413-9.

Rawe VY, Boudri HU, Alvarez Sedo C, Carro M, Papier S, Nodar F. Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. *Reprod Biomed Online* 2010;20:320-3. 1191-9.

Said T, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Baumann T, Kriegel C, et al. Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction

outcomes: an in vitro model. *Biol Reprod* 2006; 74:530-7.

Said TM, Agarwal A, Zborowski M, Grunewald S, Glander HJ, Paasch U. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *J Androl* 2008;29:134-42.

Said TM, Land JA. Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2011;17: 719-33.

Sakkas D, Seli E, Manicardi GC, Nijs M, Ombelet W, Bizzaro D. The presence of abnormal spermatozoa in the ejaculate: did apoptosis fail? *Hum Fertil (Camb)* 2004;7:99-103.

P-011 EL NIVEL DE ESTRES OXIDATIVO EN SEMEN NO SE RELACIONA CON LOS PARAMETROS SEMINALES Y NO AFECTA LOS RESULTADOS REPRODUCTIVOS EN CICLOS DE ICSI CON OVOCITOS DE DONANTE

A. Pujol(1), A. Obradors(1), E. Esteo(1), B. Costilla(1), D. García(2), V. Vernaeva(2), R. Vassena(2)
(1) Clínica EUGIN, Barcelona. (2) Fundació EUGIN, Barcelona
rvassena@eugin.es

INTRODUCCIÓN:

Las especies del oxígeno reactivas (ROS) son moléculas o átomos con electrones desaparejados que las hacen reactivas con otras moléculas. Las ROS son importantes en la regulación de funciones celulares normales en los espermatozoides como son la capacitación, la reacción acrosómica, la hiperactivación o la interacción con el ovocito. Se requiere de un delicado equilibrio entre ROS y antioxidantes para un proceso de fecundación eficiente; un desequilibrio entre estos dos factores causa estrés oxidativo (EO). El EO puede perjudicar a la fecundación afectando la membrana espermática o dañando el ADN del espermatozoide. La relación entre EO y las técnicas de reproducción asistida está en discusión; hay datos contradictorios referentes a la relación con las características seminales y los resultados reproductivos.

OBJETIVOS:

El objetivo de este estudio prospectivo es averiguar si los niveles de EO encontrados en el eyaculado están relacionados con las características seminales o los resultados reproductivos en ciclos de reproducción asistida hechos con donación de ovocitos y ICSI.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Entre octubre de 2013 y diciembre de 2014 se obtuvieron muestras de semen de 132 pacientes que realizaban un ciclo de ICSI con donación de ovocitos. Las muestras de semen fueron analizadas siguiendo la guía de la OMS. Se midió volumen, concentración, motilidad (% de formas a+b) y morfología (% de espermatozoides normales). Poco después de la obtención, las muestras se congelaron para un futuro uso en ciclos de ICSI y, la muestra sobrante, se

utilizó para el estudio. Para establecer el nivel de EO de cada muestra, se aplicó un test colorimétrico basado en el NBT (nitro blue tetrazolium). El test mide los niveles de anión superóxido presentes en el eyaculado.

Se aplicaron análisis de correlación estadística para establecer la relación entre el nivel de EO y la edad del paciente, parámetros seminales, tasa de fecundación y morfología embrionaria (Sperman's rho). Para evaluar el impacto del EO en la tasa de embarazo bioquímico, clínico evolutivo, se utilizó un modelo de regresión logística, ajustado por número de embriones transferidos y día de desarrollo embrionario.

RESULTADOS:

El nivel de EO en las muestras se distribuyó en muy alto (1.5%), alto

(43.2%), bajo (30.3%) y muy bajo (25%). Los parámetros seminales medidos fueron: volumen (ml)= 4.2 (SD 2.1); concentración (millones/ml)= 61.6 (SD 59.8); motilidad (%a+b)= 47.4 (SD 18.0) y espermatozoides normales (%)= 8.2 (SD 5.1). Treinta (22.3%) de los pacientes no empezaron un ciclo de FIV y hubo 1 fallo de fecundación (0.8%). De los 101 pacientes que llegaron a transfer, el 55.4% resultaron en embarazo bioquímico, el 46.5% en clínico y el 43.6% en embarazo evolutivo.

El nivel de EO no se relacionó con los parámetros seminales ni con las tasas de fecundación y de embarazo.

CONCLUSIONES:

Según nuestros resultados, testar los niveles de EO en semen indiscriminadamente en todos los pacientes no es recomendable. Los resultados reproductivos obtenidos con ovocitos de mujeres jóvenes aplicando ICSI parece que no están afectados por

los niveles de EO del eyaculado. El daño en el ADN espermático inducido por el EO puede ser mitigado por los mecanismos de reparación del ovocito, sobretodo en ovocitos procedentes de mujeres jóvenes. Por otro lado, realizando ICSI, se seleccionan espermatozoides con buena motilidad, por tanto, aquellos a los que el EO no ha inducido daño en la membrana espermática.

P-012 ANÁLISIS DE RESULTADOS DE CICLOS DE FIV/ICSI CON ESPERMATOZOIDES PROCEDENTES DE BIOPSIA TESTICULAR SEGÚN LA ETIOLOGÍA DE LA AZOOSPERMIA

P. Navas Bastida, MC. Gonzalvo López, A. Benítez Martín, B. Romero Guadix, ML. López Regalado, V. Díaz Prado, M. Luengo Díaz, IM. Sánchez Castelló, J. Mozas Moreno, I. Rodríguez Fernández, JA. Castilla Alcalá.
Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada
navasbastida@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

Aproximadamente el 10% de los casos de esterilidad por factor masculino se deben a azoospermia. Mediante biopsia testicular, en algunos casos, se pueden obtener espermatozoides que posteriormente serán usados en las técnicas de reproducción asistida (TRA) mediante ICSI. Sin embargo, la etiología de la azoospermia puede ser muy variada y los resultados de las TRA pueden variar según la misma.

OBJETIVOS:

Comparar las tasas de embarazo clínico en parejas cuya causa de infertilidad es la azoospermia post-vasectomía versus otras causas de azoospermia.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se realizó un estudio retrospectivo caso-control en parejas sometidas a ICSI con biopsia testicular de hombres post-vasectómicos comparado con otros casos de biopsia testicular causada por otra etiología, siendo ésta la única causa de infertilidad de la pareja. Los datos recogidos comprenden desde 2005 hasta 2013. El tejido testicular

se obtuvo mediante aguja Trucut, y la muestra con espermatozoides obtenida fue criopreservada hasta la realización de la ICSI. Los datos fueron analizados con el programa SPSS 20 para Mac.

RESULTADOS:

Se obtuvieron 283 biopsias testiculares de 135 hombres en total, de las cuales 78 fueron de pacientes post-vasectómicos (27,5%) y 57 de pacientes azoospermicos por otras causas (20,1%). En todos los casos se obtuvo material suficiente para su criopreservación. El rango de edad de los hombres post-vasectómicos fue de $43,6 \pm 6,1$ años y $34 \pm 3,4$ años para sus parejas, mientras que para la azoospermia debida a otras causas fue de $33,7 \pm 4,6$ años para los hombres y $32,6 \pm 3,4$ para las mujeres. Para este parámetro existieron diferencias significativas en la edad del varón, que fue significativamente mayor en el grupo post-vasectómico ($p < 0,001$), pero no en la edad media de las mujeres ($p = 0,07$). El promedio de hijos con una pareja anterior fue de $2,1 \pm 0,7$ y el tiempo medio de arrepentimiento de la esterilización masculina fue de $12,1 \pm 4,8$ años. Se realizaron 127 ciclos de FIV/ICSI en el grupo de estudio y

105 en el grupo control. No existió diferencia en la tasa de gestación entre los dos grupos analizados (33% vs 33%) ($p = 0,36$). La tasa de aborto espontáneo indicó un 30,3% en los pacientes post-vasectómicos mientras que en el grupo con azoospermia por otras causas fue del 21,2%. La tasa de gestación según el número de ciclos realizados en pacientes post-vasectómicos fue del 25,6% durante el primer ciclo, en el segundo ciclo se obtuvo una tasa de gestación del 29,2%, en el tercero un 16,6% mientras que en el cuarto ciclo fue del 0%. La tasa de aborto espontáneo durante el primer ciclo fue del 5,1%, mientras que en el segundo ciclo fue del 12,2%.

CONCLUSIONES:

Es posible restaurar la fertilidad mediante biopsia testicular y posterior fertilización con ICSI, con una tasa de éxito global del 32,2% de recién nacido por pareja. El rango de edad de los hombres con azoospermia post-vasectomía es mayor que en el grupo de otras causas. Sin embargo, la causa de azoospermia no afecta, según nuestros resultados, al número de embarazos obtenidos.

P-013 UTILIDAD DE LA TASA DE RECIÉN NACIDO VIVO EN LA EVALUACIÓN DE RESULTADOS DE PAREJAS CON MUJERES AFECTAS DE SOP SOMETIDAS A INSEMINACIÓN INTRAUTERINA Y/O FIV/ICSI.

IM. Sánchez Castelló, MC. Gonzalvo López, J. Puertas Sanabria, A. Guzmán Olmedo, L. Martínez Granados, V. Díaz Prado, M. Luengo Díaz, M. López Regalado, J. Fontes Jiménez, JA. Castilla Alcalá
Unidad de Reproducción Humana. Hospital Materno Infantil Virgen de las Nieves. Granada
isascastello@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

El SOP aparece con una frecuencia del 5-10% en la población femenina en edad fértil. En la Unidad de Reproducción del HUVN nos preguntamos si realmente es útil la realización de ciclos de IUI a estas pacientes.

OBJETIVOS:

Evaluar los resultados obtenidos en los protocolos de inducción de la ovulación con gonadotropinas en ciclos de Inseminación Intrauterina (IUI) en mujeres con SOP resistentes al Citrato de Clomifeno (CC) frente a los de parejas con EOD entre los años 2000-2013, y analizar los resultados de FIV/ICSI en dichos grupos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se llevó a cabo un estudio casos-controles retrospectivo en el que se analizaban los resultados de 625 protocolos de inducción de la ovulación en ciclos de IUI en mujeres con SOP y resistencia al tratamiento con CC y de 752 ciclos en parejas con EOD. Además se estudiaron un total de 225 ciclos de FIV/ICSI en mujeres con SOP y 1620 ciclos en parejas con EOD.

Los parámetros estudiados tanto en los ciclos de IUI como en los de FIV/ICSI fueron la duración (en días) de los protocolos de estimulación,

la necesidad de gonadotropinas, el número de ciclos cancelados, la tasa de gestación, de abortos y de recién nacido vivo (RNV) por ciclo. Se utiliza el test x2 para variables cualitativas y el test de la t de Student para variables cuantitativas.

RESULTADOS:

Ciclos de IUI: De los 625 ciclos de inducción de la ovulación realizados al grupo afectado por SOP, se consiguió embarazo clínico en 75 (12%), de los cuales 31 finalizaron en aborto (41.3%). La tasa de cancelación fue del 19.3%. En el grupo con EOD se consiguió embarazo clínico en 65 de los 752 ciclos estudiados (8.6%). De ellos, 9 finalizaron en aborto (13.8%), y la tasa de cancelación fue del 9.8%.

La tasa de gestación por ciclo es mayor en el grupo SOP, aunque no alcanza la significación estadística ($p=0.05$). Las tasas de cancelación y aborto son significativamente mayores en el grupo SOP ($p < 0.007$ y $p < 0.00001$ respectivamente). Sin embargo, la tasa de RNV por ciclo no presenta diferencias significativas, siendo del 7.04% en SOP y del 7.44% en parejas con EOD.

Ciclos de FIV/ICSI: De los 225 ciclos realizados al grupo SOP se consiguió embarazo clínico en 53 (23.5%), de los cuales 20 abortaron (37.7%). La tasa de cancelación fue del 18.2%. En el grupo

con EOD se consiguió embarazo clínico en 326 de los 1620 ciclos analizados (20.1%). De ellos 53 finalizaron con aborto (16.2%), y la tasa de cancelación fue del 16.36%. Las tasas de gestación por ciclo y cancelación fueron similares en ambos grupos. Sin embargo, la tasa de aborto fue significativamente mayor en el grupo de SOP (37.7% frente a 16.2%). En cuanto a la tasa de RNV por ciclo, no se encontraron diferencias significativas en dichos grupos, siendo del 14.7% en el grupo afectado por SOP y del 16.8% en parejas con EOD.

CONCLUSIONES:

Los protocolos de inducción de la ovulación con gonadotropinas en ciclos de IUI y FIV/ICSI constituyen un tratamiento útil para mujeres afectadas por SOP y resistencia al CC ya que los resultados en términos de RNV son similares a los encontrados en ciclos llevados a cabo en otras indicaciones, aunque se ha descrito un mayor riesgo de embarazo múltiple y Síndrome de Hiperestimulación Ovárica. Según nuestros resultados, estas pacientes presentan mayores tasas de cancelación y aborto en ciclos de IUI, y mayores de aborto en FIV/ICSI. Por tanto, sería necesario desarrollar una línea de investigación que nos permita encontrar unas pautas adecuadas para disminuir las tasas actuales de pérdida reproductiva en pacientes con SOP.

P-014 ELABORACIÓN DE UN NUEVO PROTOCOLO EN LA VALORACIÓN DE MUESTRAS POST-VASECTOMÍA

MI. Jiménez García (1), V. Moreno Carbonell (2), M. Molina Espejo (1), C. Gamero Villarroel (1), I. Sánchez Rodríguez (1), R. Romero (1), G. Lozano Cordero (1), A. Ortiz Ruiz (1)
 (1) Laboratorio Andrología Centro Extremo de Reproducción Humana Asistida. Complejo Hospitalario Universitario Infanta Cristina. Badajoz, (2) Hospital de Mérida, Badajoz
maribeljvaldivia@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

El asesoramiento preoperatorio de la vasectomía debe incluir métodos alternativos de anticoncepción, tasas de complicación y fracaso y la necesidad de análisis de semen postoperatorio.

Según las últimas recomendaciones para el control de vasectomía(1), tras el análisis de semen se puede dar depuración en caso de no observar espermatozoides y en el caso de escasos espermatozoides inmóviles (<100.000 esp/mL) en el eyaculado 3 meses después del procedimiento y tras al menos 20 eyaculaciones.

OBJETIVOS:

Revisar nuestros resultados y las guías de las sociedades científicas implicadas para valorar posibles modificaciones en el protocolo de control analítico del paciente vasectomizado, con el fin de reducir el número de controles y de consultas que deben realizar estos pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se recogió mediante el SIL el histórico de recuento total de espermatozoides realizados en los pacientes que realizaron controles de vasectomías entre Enero y Octubre del 2014.

El protocolo del análisis y procesamiento de la muestra de semen se basa en las instrucciones de la 5ª ed. del Manual de la OMS(2) y en el Documento Técnico del Comité Científico de la SEQC(3) para este tipo de muestras.

Las variables categóricas se muestran como número y porcentaje.

RESULTADOS:

Durante el periodo de estudio, 218 pacientes entregaron muestras de semen para su control post-vasectomía. Los seminogramas correspondientes a esos pacientes fueron de 423, incluyéndose los que se encontraban en el histórico del SIL (Tabla 1).

por no haberse cumplido la fecha de realización del segundo control (7 meses) establecido en nuestro protocolo hasta el momento.

De aquellos pacientes que presentaron en el primer control cifras de espermatozoides inmóviles < 100.000 / ml (un total de 212, correspondientes al

Número de controles	N	%
1	218	100
2	153	70
3	29	13
4	17	7
5	6	3

Tabla 1: Número de controles realizados por paciente.

Recuento (espermatozoides /ml)	N	%
No se observan espermatozoides	135	62
1 -1000 inmóv	73	33
1000-10.000 inmóv	0	0
10.000-100.000 inmóv	6	3
100.000-1.000.000 inmóv	2	1
>10 ⁶ móviles	2	1
Total	218	100

Tabla 2: Resultado de los pacientes tras el primer control.

Los resultados del primer control, realizado aproximadamente a los 4 meses tras la operación se muestran en la Tabla 2. Hubo 135 pacientes de los que no se observaron espermatozoides en este primer control, pero 65 no entregaron una segunda muestra para confirmar la ausencia de espermatozoides, probablemente

98 % de la muestra), 136 se realizaron un segundo control tras haber sido informado el primero (en tan sólo 10 meses de duración de nuestro estudio).

2 pacientes mostraron más de 100.000 espermatozoides inmóviles/mL tras su primer control postvasectomía, que tras un segundo control mostraron una

concentración <56.000 espz/mL.

En 2 pacientes encontramos una alta concentración (>1 mill espz/mL) de espermatozoides móviles ya en el primer control.

CONCLUSIONES:

De los datos de nuestra evaluación concluimos que un 98% de hombres a quienes se le realizó la vasectomía como método anticonceptivo podían haber sido dados de alta tras el primer control, sin necesidad de requerir más controles confirmatorios atendiendo a los criterios establecidos en las guías de la EAU(1) y CUA(4).

Además, debido a la presencia de espermatozoides residuales, existe un porcentaje no despreciable de pacientes (13%) que acaban entregando 3 seminogramas o más para recibir el alta, que se hubieran podido ahorrar aplicando las recomendaciones anteriormente citadas.

En nuestro estudio se detectaron 2 casos de fallo de la técnica quirúrgica que, no obstante, fueron detectados con un control a los 4 meses.

El protocolo que se propone es hacer el primer análisis tras un mínimo de 3-4 meses desde la cirugía y haber tenido, al menos, 25 eyaculaciones.

En este análisis puede:

No observarse espermatozoides en la muestra analizada (<56.000/mL).

Observarse espermatozoides inmóviles en la muestra, pero insuficientes para realizar una estimación precisa de la concentración (<56.000/mL).

Evaluarse una concentración de espermatozoides inmóviles <100.000/mL.

Evaluarse una concentración de espermatozoides inmóviles >100.000/mL.

Encontrarse espermatozoides móviles en la muestra.

Si los resultados son 1,2 ó 3, de acuerdo con las recomendaciones de las sociedades científicas antes citadas, se puede dar el alta al paciente no siendo necesario repetir el análisis.

En el supuesto 4 (>100.000

espermatozoides inmóviles/mL) debe repetirse el análisis en 2-3 meses.

En el supuesto 5 (observación de espermatozoides móviles) se deben repetir los controles y valorar la necesidad de una nueva intervención.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Dohle G.R, Diemer T, Kopa Z, Krausz C, Giwercman A, Jungwirth A. European Association of Urology guidelines on vasectomy. *Actas Urológicas Españolas, Volume 36, Issue 5, May 2012, Pages 276-281.*
2. WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen. Cooper T. Cambridge University Press, 2010. Cambridge (UK).
3. Sánchez Pozo MC, Sánchez Prieto I, Jiménez García MI. Recomendaciones para la estandarización del análisis de semen posvasectomía. Comité Científico. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Documentos de la SEQC, Barcelona 2012. ISSN: 2013-5750.
4. Zini A. Vasectomy Update 2010. Canadian Urological Association. Quebec, Oct 2009.

P-015 ¿EXISTE UNA RELACIÓN ENTRE LAS DIVISIONES EMBRIONARIAS ACELERADAS EN DÍA 3 Y EL PORCENTAJE DE ANEUPLOIDÍA?

A. Rodríguez Arnedo (1), J. Ten Morro (1), MC. Tió Marquina (1), H. Blanca Ordóñez (1), MC. Díaz Martínez (1), B. Lledó Bosch (2), J. Llácer Aparicio (1), R. Bernabéu Pérez (1)
 (1) Instituto Bernabeu Alicante, Alicante. (2) Instituto Bernabeu Biotech, Alicante
jten@institutobernabeu.com

INTRODUCCIÓN:

La selección embrionaria mediante criterios morfocinéticos es la estrategia general establecida durante la realización de un tratamiento de fecundación in vitro (FIV). En los criterios de selección se ha propuesto que un embrión debe seguir una cinética de división determinada que lo clasifique dentro de un rango de normalidad o

buena calidad embrionaria (tipos A y B, criterios ASEBIR). Pero ¿qué ocurre cuando un embrión no cumple estos criterios por presentar un desarrollo acelerado, con más de 10 células en día 3 de desarrollo? Se ha comprobado en diferentes estudios (Luna y col. 2008; Cruz y col. 2012) que los embriones que presentan una cinética de división acelerada en día 3 alcanzan en mayor proporción la fase de blastocisto y que

el grado de expansión de éstos es mayor que en los embriones de desarrollo "normal". Por otro lado, Lindsay y col. 2015, establecieron que un ritmo de división acelerado en día 3 estaba relacionado con una mayor tasa de aneuploidias embrionarias, realizando la biopsia del embrión en el tercer día de desarrollo.

OBJETIVOS:

El objetivo de este trabajo es determinar si el número de células en día 3 de cultivo embrionario está relacionado con una mayor tasa de aneuploidias cuando se realiza la biopsia en día 5 o día 6.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se analizó retrospectivamente el total de los embriones biopsiados en fase de blastocisto para realización de CCS (Comprehensive chromosome screening) desde Enero de 2014 hasta Marzo de 2015 (559 embriones). Se establecieron dos grupos: grupo A, embriones que presentaban menos de 10 células en día 3 (518 embriones), grupo B, embriones que presentaban número de células mayor o igual a 10 en día 3 (41 embriones). Se establecieron como factores de confusión la edad materna y el día de la biopsia embrionaria (día 5 o día 6).

RESULTADOS:

Se calculó el porcentaje de aneuploidias (AR) para cada uno de los grupos y se

realizó la Prueba de Chi-cuadrado de Pearson. Para el grupo A, se obtuvo una AR de un 44.8% y para el B de 43.9%, sin alcanzar significación estadística ($P=0.523$).

CONCLUSIONES:

Los criterios de clasificación embrionaria son una herramienta necesaria para el trabajo del laboratorio de FIV. Los avances en biología molecular nos proporcionan metodologías complementarias que nos facilitan la selección del embrión transferible entre una cohorte homogénea (CCS), mediante esta herramienta podemos seleccionar el embrión cromosómicamente y morfológicamente. Gracias a los resultados obtenidos en este estudio observamos que embriones previamente clasificados como embriones de peor pronóstico por presentar un mayor número de células en día 3, no solo alcanzan la fase de blastocisto dando lugar a embriones de buena morfología, sino que además el porcentaje de aneuploidias no se ve incrementada por este factor.

BIBLIOGRAFÍA:

Cruz M, Garrido N, Herrero J, Pérez-Cano I, Muñoz M, Meseguer M. Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod Biomed Online* 2012;25:371-381.

Lindsay L. Kroenes, MD., Gayane Ambartsumyan, M.D. PhD., Margareta D. Pisarska, M.D., Christine Briton-Jones, Ph.D., H.C.L.D., Mark Surrey, M.D., and David Hill, Ph.D., H.C.L.D. Increased blastomere number in cleavage-stage embryos is associated with higher aneuploidy. *Fertil Steril* 2015; 103:694-698.

Luna M, Copperman AB, Duke M, Ezcurra D, Sandler B, Barritt J, Human blastocyst morphological quality is significantly improves in embryos classified as fast on day 3 (?10 cells), bringing into question current embryological dogma. *Fertil Steril* 2008; 89:358-363.

P-016 ¿EL DÍA APROPIADO PARA LA DESVITRIFICACIÓN EMBRIONARIA DEPENDE DEL ESTADIO DE DESARROLLO EN EL QUE SE VITRIFICARON LOS EMBRIONES?

C. Álvarez Lleó, M. Sánchez Toledo, C. García Garrido, M. Resta Serra, G. González De Merlo
Hospital general Universitario de Albacete, Albacete
cristina10lleo@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

Uno de los objetivos prioritarios en reproducción asistida es disminuir la tasa de embarazos múltiples. La criopreservación embrionaria permite la transferencia secuencial y diferida de todos los embriones generados durante un ciclo FIV. Los embriones se pueden vitrificar: por producción de un número elevado de embriones, como estrategia terapéutica en casos de alteración de la receptividad endometrial, por riesgo de Síndrome de Hiperestimulación

Ovárica, así como por cualquier causa que implique cancelar la transferencia.

La desvitrificación embrionaria se puede realizar el mismo día de la transferencia o incluso uno o varios días previos a la misma con la intención de ver la evolución de los embriones.

OBJETIVOS:

Comparar según el día en el que se vitrificaron los embriones (D+2, D+3 o D+5), que día es el más apropiado para

su desvitrificación, el día previo o el día de la transferencia.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo, 429 ciclos de desvitrificación embrionaria (292 pacientes) realizados desde enero 2010-marzo 2015.

La vitrificación fue en "cryotip" (Vit Kit®- Freeze, Irvine Scientific) Los ciclos se dividieron en tres grupos según día de desarrollo en el que se vitrificaron

los embriones: D+2, D+3 y D+5. En cada grupo se compararon los resultados de los ciclos desvitrificados el mismo día de la transferencia con los desvitrificados el día previo.

Se comparó: edad, calidad de embriones desvitrificados, supervivencia embrionaria, número y calidad de embriones transferidos, tasa de beta-hCG+, de embarazo clínico y de aborto. La significación de las diferencias se estimó utilizando el test de t-Student y análisis de Chi2($p < 0,05$)

RESULTADOS:

Se estudiaron 429 ciclos, en 37 todos embriones degeneraron y en 36 no fueron evolutivos. Cada grupo (D+2, D+3 y D+5) se subdividió en dos subgrupos (I-II), según el día en que se desvitrificaron los embriones, el día de la transferencia (I) o el previo (II) Grupo (D+2): En el subgrupo I ($n=16$) la edad fue $36,25 \pm 2,79$, en el II ($n=43$) $34,64 \pm 4,16$. Se encontraron diferencias significativas entre el I-II en el número de embriones transferidos AB ($0,00 \pm 0,00$ vs $0,26 \pm 0,50$; $p=0,001$), siendo similar el número de embriones transferidos en cada subgrupo ($1,69 \pm 0,47$ vs $1,79 \pm 0,47$; $p=0,482$), respectivamente.

La tasa de beta-hCG+, embarazo clínico y aborto no se comparó estadísticamente debido al pequeño tamaño muestral.

Grupo (D+3): En el subgrupo I ($n=42$) la edad fue $34,93 \pm 3,66$, en el II ($n=134$) $34,66 \pm 3,49$. No encontramos diferencias entre los subgrupos (I-II) en: número de embriones transferidos, calidad de los mismos, tasa de beta-hCG+ ($33,3\%$ vs $22,4\%$) y de embarazo clínico ($31,0\%$ vs $20,1\%$) La tasa de aborto fue similar, aunque no se comparó estadísticamente.

Grupo (D+5): En el subgrupo I ($n=44$) la edad fue $34,70 \pm 3,57$, en el II ($n=78$) $34,46 \pm 3,89$. Se encontraron diferencias significativas entre el subgrupo (I-II) en: número de embriones transferidos ($1,75 \pm 0,49$ vs $1,54 \pm 0,50$; $p=0,025$) y número de embriones AB transferidos ($0,18 \pm 0,45$ vs $0,47 \pm 0,62$; $p=0,003$), siendo menor el número de embriones transferidos pero de mejor calidad en el subgrupo II. También se encontraron diferencias en la tasa de beta-hCG+ ($27,30\%$ vs $35,91\%$; $p=0,048$) y embarazo clínico ($20,50\%$ vs $34,60\%$; $p=0,035$) siendo mayores en el subgrupo II. La tasa de aborto no se comparó estadísticamente ($22,2\%$ vs $44,4\%$).

CONCLUSIONES:

-El día de la desvitrificación no afecta a los resultados del ciclo en embriones vitrificados en D+2-D+3 de desarrollo.

-En el grupo D+5, cuando los embriones se desvitrificaron el día previo a la transferencia, los embriones transferidos eran de mejor calidad y aumentaba la tasa de embarazo clínico.

-La desvitrificación de blastocistos el día previo a la transferencia permite seleccionar mejor los embriones para transferir mejorando los resultados del ciclo.

BIBLIOGRAFÍA:

-Wong KM, Mastenbroek S, Repping S. Cryopreservation of human embryos and its contribution to in vitro fertilization success rates. *Fertil Steril* 2014; 102:19-26.

-Veleva Z, Orava M, Nuojua-Huttunen S, Tapanainen JS, Martikainen H. Factors affecting the outcome of frozen-thawed embryo transfer. *Hum Reprod* 2013; 28: 2425-31.

P-017 EL TIPO DE ALTERACIÓN CROMOSÓMICA QUE SE DETECTA EN LOS EMBRIONES ANEUPLOIDES DEPENDE DE LA EDAD MATERNA

JA. Ortiz Salcedo (1), B. Lledó Bosch (1), R. Morales Sabater (1), I. Ochando Sánchez (2), J. Llácer Aparicio (3), R. Bernabeu Pérez (3) (1) Instituto Bernabeu Biotech, Alicante (2) Instituto Bernabeu Albacete, (3) Instituto Bernabeu Alicante
jaortiz@institutobernabeu.com

INTRODUCCIÓN:

En la actualidad la edad de la mujer que acude para recibir asesoramiento reproductivo es muy superior a la de hace unos años. Por tanto entre los pacientes que se someten a un tratamiento de fertilidad existe un grupo importante de mujeres con edad avanzada que tendrán un peor pronóstico en un ciclo de FIV. La

alta tasa de aneuploidías embrionarias es uno de los principales factores que afectan a la capacidad implantatoria de los embriones en este grupo de pacientes. El Screening Cromosómico Completo (CCS) permite determinar el tipo de alteración cromosómica presente en estos embriones, en función del rango de edad materna.

OBJETIVOS:

Determinar si existe una relación entre la edad materna y el tipo de aberraciones cromosómicas observadas en blastocistos procedentes de ciclos de FIV.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Diseño y duración:

Estudio observacional retrospectivo realizado entre enero de 2013 y enero 2015 en nuestras clínicas de fertilidad.

Tamaño de la muestra:

El estudio incluye el análisis mediante array-CGH (Hibridación Genómica Comparada) de 585 blastocistos procedentes de 197 pacientes. Se han incluido 518 blastocistos con edades maternas iguales o inferiores a 40 años de edad y 67 con más de 40 años.

Análisis estadístico:

El estudio de la asociación entre las variables, se analizó mediante regresión logística binaria y la prueba de Chi-cuadrado.

Screening Cromosómico Completo (CCS):

Los desequilibrios cromosómicos se detectaron mediante array-CGH en células de trophoctodermo de embriones biopsiados en día +5 tras la fecundación (D5). El análisis de array-CGH se realizó empleando la plataforma de Agilent (SurePrint G3 8x60K).

RESULTADOS:

La tasa de aneuploidía embrionaria aumenta con la edad materna, desde un 31,3 % en embriones con una edad materna inferior a 30 años, un 36,1% en el rango de 31 a 35 años, un 49% en edades maternas comprendidas entre 36 a 40 y un 65,7% para edades superiores a 40 años ($p < 0,05$).

El análisis de CCS mediante array-CGH y transferencia de los embriones euploides da como resultado una tasa de implantación (43,9 %) que es independiente de la edad materna ($p = 0,445$).

Globalmente, el 41,4% de los embriones analizados eran aneuploides, de los cuales 65,3% tenían monosomía/s y un 46,2% trisomía/s. No se detectaron diferencias significativas en la tasa de monosomías en blastocistos aneuploides entre las pacientes < 40 años de edad (67,7%) y > 40 años de edad (61,4%) $p = 0,422$. Por el contrario, las trisomías aumentaron de una manera estadísticamente significativa entre ambos grupos de edad (42,6% frente a 65,9%; $p = 0,005$).

Tras el análisis individual de cada uno de los cromosomas, se observó que la mayoría no modifican su tasa de

aneuploidías con el aumento de la edad materna, sólo en los cromosomas 2, 11, 13, 15, 16, 21 y 22 se observó un aumento estadísticamente significativo. Sorprendentemente, en el cromosoma 3, se observa el efecto contrario, este cromosoma aparece alterado con menos frecuencia en embriones aneuploides con mayor edad materna.

CONCLUSIONES:

La selección de los embriones euploides mediante Screening Cromosómico Completo (CCS) en ciclos de FIV, es capaz de corregir el efecto deletéreo que ejerce la edad materna en la implantación embrionaria.

Esta investigación revela además que todos los tipos de aneuploidías embrionarias no son equiprobables. Las trisomías son menos frecuentes que las monosomías pero las primeras se incrementan con la edad materna, principalmente en los cromosomas 2, 11, 13, 15, 16, 21 y 22.

P-018 ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS EN MÁS DE 58000 BLASTOCISTOS ANALIZADOS MEDIANTE ARRAYS DE HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA (ACGH)

M. Sandalinas Alabert (1), E. Garcia Guixé (1), C. Arjona Fernández (1), E. Alsina Xiol (1), E. Toro Toro (1), E. Balius Fort (1), T. Escudero (2), P. Colls (2), C. Giménez (1), S. Munné (2)
(1) Reprogenetics Spain, Barcelona, (2) Reprogenetics
msandalinas@reprogenetics.es

INTRODUCCIÓN:

Previos estudios han determinado que aproximadamente la mitad de los embriones obtenidos en un programa de FIV son cromosómicamente anormales. La aneuploidía aumenta con la edad materna y es una de las principales causas de la disminución en

la implantación y las tasas de embarazo evolutivo en mujeres mayores de 35 años.

OBJETIVOS:

Estudio retrospectivo de los resultados de anomalías cromosómicas en blastocistos mediante DGP de aCGH.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Durante los años 2011-2015 se han analizado 58601 blastocistos provenientes de 12275 ciclos de DGP de screening de aneuploidías mediante aCGH. Los datos fueron analizados según la edad materna y según las anomalías encontradas

(embriones euploides o aneuploides, con monosomías o con trisomías, con aneuploidía simple, doble o compleja, o bien con aneuploidía total o parcial).

RESULTADOS:

Los resultados se detallan en la tabla 1:

La proporción de monosomías completas versus trisomías es de 1:1, aunque para las aneuploidías parciales se encuentran más pérdidas de fragmentos de cromosomas que ganancias (2.2:1).

CONCLUSIONES:

Como ya es conocido, las anomalías cromosómicas incrementan con la edad materna, desde una tasa basal del 31% en donantes de ovocitos hasta el 85% en mujeres mayores de 42 años. La complejidad de las anomalías también incrementa con la edad materna, con incremento de las aneuploidías dobles y múltiples y la disminución de las aneuploidías simples y parciales de 1 sólo cromosoma. En las aneuploidías parciales son más frecuentemente pérdidas de fragmentos de cromosomas

que ganancias, aunque en las aneuploidías totales no se observa esta tendencia. Además, las aneuploidías parciales (solas o combinadas con totales) no incrementan con la edad materna. Estas 2 tendencias diferenciadas podrían indicar distintos orígenes de las aneuploidías parciales y totales, siendo las aneuploidías totales más meióticas en origen y las parciales probablemente más mitóticas (no relacionadas con edad materna) o bien de origen paterno, siendo los fragmentos cromosómicos originados más fácilmente perdidos que ganados.

Tabla 1:

	DON	< 35	35-37	38-40	41-42	> 42
Embriones analizados (n)	12832	15103	10302	11530	5744	3090
No Resultados (%)	3%	4%	3%	3%	3%	4%
Euploides (%)	69%	63%	55%	39%	23%	15%
Aneuploides (%)	31%	37%	45%	61%	77%	85%
1 Aneuploidía (%)	52%	56%	54%	50%	39%	26%
2 Aneuploidías (%)	17%	16%	22%	25%	29%	26%
>2 Aneuploidías (%)	16%	16%	16%	20%	30%	47%
Sólo aneuploidías parciales (%)	15%	12%	8%	4%	2%	1%
% de parciales respecto del total de aneuploides (%)	15%	13.6%	16.3%	12%	15%	22%

*DON: donantes de ovocitos.

P-019 PREVALENCIA DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN UNA POBLACIÓN DE DONANTES DE SEMEN

A. Yoldi Chauré (1), M. Gañán Parra (1), A. Vaquero Argüelles (1), R. Díaz Giráldez (2), R. Molina García (1), P. Carrasco Salas (3), J. López Siles (3), JA. Ángel Pérez (3), JP. Ramírez López (1), JA. Castilla Alcalá (1), S. Zamora López (1) (1) CEIFER, Granada, (2) MásVida Reproducción, Sevilla, (3) Genetaq, Centro de Genética Molecular, Sevilla calidad@ceifer.com

INTRODUCCIÓN:

El virus del papiloma humano (VPH) es uno de los patógenos más comúnmente transmitidos mediante relaciones sexuales tanto en hombres como en mujeres. Se han identificado más de 100 serotipos de VPH, de los cuales aproximadamente 40 infectan el tracto genital. Se ha descrito por diversos autores una disminución de las tasas de fecundación y gestación así como aumento de las tasas de aborto cuando se utilizan muestras de semen con VPH en Fecundación in vitro e Inyección espermática intracitoplasmática.

OBJETIVOS:

Determinar la prevalencia del virus del papiloma humano en una población de donantes de semen.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se analizaron 678 eyaculados de semen criopreservados entre los años 2010 y 2014 en pajuelas CBS de alta seguridad biológica procedentes de 210 donantes de semen. 435 eyaculados de semen habían sido criopreservados tras adición directa del medio crioprotector en el eyaculado y posterior congelación

mediante sistema computerizado para la programación de la curva de bajada de la temperatura. 243 eyaculados de semen habían sido criopreservados previa selección de los espermatozoides móviles del eyaculado mediante gradientes de densidad de percoll, adición del medio crioprotector y posterior congelación mediante sistema computerizado para la programación de la curva de bajada de la temperatura. Las muestras se descongelaron mediante un protocolo de descongelación rápida a temperatura ambiente durante 10 minutos y se determinó la presencia de VPH mediante PCR convencional.

En caso de resultar positiva, la detección del producto amplificado se realizó tras electroforesis en agarosa y tinción con bromuro de etidio.

La tipificación posterior del producto de amplificación fue obtenida mediante secuenciación.

RESULTADOS:

Ningún donante presentó síntomas clínicos de infección por VPH en el momento de la donación de semen. De los 210 donantes estudiados, la PCR para VPH resultó negativa en

206 (98%), no valorable en 3 (1,5%) y positiva en 1 (0,5%), en la que se detectó la presencia de ADN procedente de VPH tipo 66.

CONCLUSIONES:

La prevalencia observada (0,5%) es menor a la recogida en la bibliografía por distintos autores (3-10%). Esto puede ser debido a los altos valores utilizados como estándares en el banco de semen para considerar una muestra de semen apta para donación (concentración > 80x10⁶ espermatozoides/mL; movilidad total > 50%; morfología > 15%), ya que

varios estudios han demostrado que la presencia de VPH en muestras de semen se asocia frecuentemente con una alteración de los parámetros seminales como el volumen, viscosidad, pH, concentración, movilidad y vitalidad. La presencia de VPH en el semen de donante plantea riesgos para las mujeres que se someten a TRHA con semen de donante y, por tanto, la inclusión de la detección en el semen de donante del VPH en el screening de enfermedades de transmisión sexual durante la selección de donantes mejoraría la seguridad de las pacientes.

P-020 EVIDENCIA DE BAJA RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN CON GONADOTROPINAS EN PACIENTES ENDOMETRIÓSICAS SOMETIDAS A FIV/ICSI, SIN ALTERACIÓN DE LA CALIDAD EMBRIONARIA.

MC. Gonzalvo López, A. Clavero Gilabert, ML. López Regalado, V. Díaz Prado, AJ. Paredes Fuentes, J. Casas Díaz, MJ. Cuevas Beltrán, M. Luengo Díaz, L. Martínez Granados, P. Navas Bastida, JA. Castilla Alcalá
U. Reproducción. Complejo Hospitalario Granada. IBS Granada. Granada
anaclaveroGilabert@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

Es ampliamente aceptado que la endometriosis provoca efectos negativos sobre la fecundidad de la mujer, sin embargo, el mecanismo por el cual los produce continúa sin conocerse correctamente. Se han propuesto diversas teorías al respecto, incluyendo la alteración de la función ovárica, disminución de la reserva folicular o reducción de la calidad tanto de los ovocitos como de los embriones.

OBJETIVOS:

Este estudio se realizó con el objetivo de comparar los resultados de las técnicas de FIV/ICSI en mujeres con endometriosis y de parejas infértiles por factor masculino (FM); para tratar de obtener evidencia sobre el impacto de la endometriosis en la gestación e investigar si afecta a los resultados de los tratamientos con FIV/ICSI actuales.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio observacional de casos y controles retrospectivo en el que se estudió 585 pacientes, sobre las que se realizaron 889 ciclos: 165 ciclos en pacientes con patología endometriósica y 724 en pacientes en las que el motivo de la infertilidad era el FM, consideradas como el grupo control. Se analizaron los parámetros de estimulación ovárica y los resultados de FIV/ICSI.

RESULTADOS:

Las pacientes endometriósicas precisaron mayor dosis de FSH en la estimulación (2645.1±882.5 vs 2162.6±824.5; p<0.001), obteniéndose posteriormente menor número de ovocitos (6.9±4.3 vs 9.2±4.8; p<0.001) y de ovocitos maduros (5.7±3.7 vs 7.5±4.5; p<0.001), aunque las tasas de fecundación fueron mayores en estas pacientes que en las del FM (65.6% vs 58.6%; p<0.001). Nuestro estudio

demuestra que la endometriosis disminuye la reserva ovárica y por tanto la capacidad de responder a los tratamientos de estimulación de la ovulación, dado que a pesar de usar dosis significativamente mayores de gonadotropinas en la estimulación de pacientes endometriósicas, se obtuvo en este grupo un 30% menos de ovocitos.

Los ovocitos obtenidos no parecen ser de peor calidad, pues la tasa de fecundación observada en parejas con endometriosis fue mayor que en parejas estériles por FM, ya que ante un número determinado de ovocitos teóricamente de buena calidad, fecundan más aquellos a los que se ofrece un semen de mejor calidad, como es el caso de las parejas estériles por endometriosis. Los embriones obtenidos de buena calidad (A/B) fueron similares en ambos grupos (1.16±0.8 vs 1.22±0.9). Las tasas de supervivencia embrionaria a la desvitrificación, de gestación clínica por

criotransferencia (28.1% vs 29.9), y de recién nacido vivo por criotransferencia (18.8% vs 24.4%) fueron mayores, pero no significativamente, en el FM. No se obtuvieron resultados estadísticamente significativos en otros parámetros analizados, como la tasa de implantación, aunque las distintas tasas de gestación analizadas, especialmente las acumuladas (embriones frescos + crioconservados), fueron superiores en el FM sin alcanzarse la significación. Sin embargo, la diferencia en la gestación estimada acumulada entre ambos grupos es mayor que en las tasas de gestación de los ciclos en fresco. Esto se debe a

que en el FM se ha criopreservado más, posteriormente se han descongelado más embriones, y esto trae como consecuencia un aumento en las tasas de gestación acumuladas mayor que en el grupo de endometriosis.

Por tanto, pensamos que si obtuviéramos con posterioridad los datos de gestación real acumulada (al añadir el resto de criopreservaciones no descongeladas aún), las diferencias en las tasas de gestación acumulada entre ambos grupos podrían ser estadísticamente significativas.

CONCLUSIONES:

La endometriosis afecta al éxito de la FIV/ICSI por reducir la respuesta ovárica a la estimulación de la ovulación, no estando afectada ni la calidad ovocitaria ni la receptividad endometrial. Creemos necesario profundizar en los factores que causan dicha disminución en la reserva ovárica, como cirugía ó fármacos previos, extensión de la enfermedad, etc.

	Endometriosis (n= 165)	Factor masculino (n= 724)
Ovocitos/punción	6.9 ± 4.3 ^a (0-20)	9.2 ± 4.8 ^a (0-35)
Ovocitos MII	5.7 ± 3.7 ^a (0-20)	7.5 ± 4.5 ^a (0-31)
%Ovocitos MII	796/953 (83.5%)	4626/5619 (82.3%)
Ovocitos fecundados	3.8 ± 2.9 (0-20)	4.4 ± 3.5 (0-22)
%Ovocitos fecundados	522/796 ^a (65.6%)	2713/4626 ^a (58.6%)
%Embriones útiles	318/522 ^b (60.9%)	1516/2713 ^b (55.9%)
Embriones transferidos	1.5 ± 0.8 (0-3)	1.4 ± 0.8 (0-2)
%Embriones transferidos	214/522 (41%)	843/2713 (31.1%)
Tasa de implantación	39/214 (18.2%)	199/843 (23.6%)
Días de transferencia:		
Día2	45.5%	46.1%
Día3	54.5%	53.9%
Embriones disponibles de buena calidad (A/B)*	1.16 ± 0.8 (0-4)	1.22 ± 0.9 (0-8)
Calidad embrionaria (% de cada tipo entre los fecundados)		
Tipo A	38/181 (21%)	219/1235 (17.7%)
Tipo B	32/181 (17.7%)	165/1235 (13.4%)
Tipo C	53/181 (29.3%)	346/1235 (28%)
Tipo D	58/181 (32%)	505/1235 (40.9%)
Media de embriones criopreservados	0.7 ± 1.5 ^b (0-12)	1.09 ± 1.8 ^b (0-10)
% Embriones criopreservados	104/522 ^b (19.9%)	673/2713 ^b (24.8%)
Punciones con al menos 1 embrión sobrante congelado	46/130 (35.4%) ^b	249/555 (44.9%) ^b

Tabla 2: resultados de laboratorio de embriología en los grupos de estudio *

Datos disponibles desde 2012

Nota: a) $p < 0,001$; b) $p < 0,05$

P-021 LA CALIDAD DE LA MASA CELULAR INTERNA Y DEL TROFOECTODERMO PREDICE EL PORCENTAJE DE ANEUPLOIDÍAS EMBRIONARIAS

MC. Díaz Martínez (1), J. Ten Morro (1), A. Rodríguez Arnedo (1), MC. Tió Marquina (1), J. Guerrero Villena (1), H. Blanca Ordóñez (1), B. Lledó Bosch (2), B. Moliner Renau (1), J. Llacer Aparicio (1), R. Bernabéu Pérez (1)
(1) Instituto Bernabeu Alicante, Alicante (2) Instituto Bernabeu Biotech, Alicante
jten@institutobernabeu.com

INTRODUCCIÓN:

Desde hace más de tres décadas la valoración morfológica ha sido el recurso más extendido y eficiente para el estudio de la calidad embrionaria. Actualmente a ello se le une el Screening Cromosómico Completo (CCS), que permite estudiar todos los cromosomas del embrión mediante la técnica de hibridación genómica comparada (array-CGH). Hay estudios que parecen demostrar que la clasificación embrionaria basada en criterios morfológicos, puede verse alterada por la selección de los embriones aptos para transferir a los que se les ha realizado un análisis mediante CCS (Forman y col. 2013). En este trabajo pretendemos aportar datos más concretos sobre qué parámetros de la morfología embrionaria podrían demostrar valor pronóstico con su diagnóstico tras array-CGH.

OBJETIVOS:

Determinar si existe correlación entre la calidad embrionaria, basada en criterios morfológicos, y en concreto valoración de masa celular interna (MCI) y de trofoectodermo (TE) embrionarios con su posterior diagnóstico genético.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio prospectivo de un total de 250 embriones a los que se les realizó CCS (enero 2014- marzo 2015). El estudio incluyó todos los embriones biopsiados tanto en día 5 como en día 6 de desarrollo y analizados mediante CCS. Se registraron las calidades de la MCI y del TE en el momento de la biopsia en 3 categorías (1, 2 y 3), correspondientes a la clasificación de Gardner (1: buena calidad, 2: calidad media, 3: mala calidad). Se analizaron el siguiente número de embriones: para la calidad de la MCI de tipo 1 (118 embriones), tipo 2 (114 embriones) y tipo 3 (18 embriones). En cuanto al TE fueron tipo 1 (91 embriones), tipo 2 (124 embriones) y tipo 3 (35 embriones). El tratamiento de los datos se hizo mediante una regresión logística binaria, siendo un factor de confusión el día de realización de la biopsia (día 5 o día 6); por lo que se ajustó el modelo, incluyendo dicha variable en el análisis, que se realizó mediante el programa SPSS (SPSS, Inc., Chicago, IL, UISA).

RESULTADOS:

De los 250 embriones analizados, se obtuvieron un total de 150 embriones

cromosómicamente normales y 100 embriones alterados. Se calculó la odds ratio (OR) de los diferentes grados de calidad tanto de la MCI como del TE. Los embriones que presentaron calidad de la MCI tipo 2 tuvieron 1.7 veces más riesgo de ser aneuploides que si eran tipo 1 ($p=0.055/IC0.98-2.88$); en cuanto a los tipo 3, presentaron 3.2 veces más riesgo ($p=0.027/IC1.14-8.92$). En relación al TE, los embriones con calidad tipo 2, tuvieron 2.3 veces más riesgo que los de calidad tipo 1 ($p=0.005/IC 1.28-4.06$), y los de calidad tipo 3, 1.4 veces más riesgo ($p=0.451$, sin significación estadística/ IC 0.60-3.12).

CONCLUSIONES:

La calidad de la MCI, así como la del TE, nos puede servir de valor predictivo en cuanto a su diagnóstico genético, puesto que los embriones que presentan calidad tipo 1, presentan menor tasa de aneuploidías que los embriones con calidades tipo 2 y 3. La clasificación embrionaria en fase de blastocisto, previa a la realización de biopsia de TE, está sesgada debido a la realización de la eclosión asistida, por lo que el grado de expansión del blastocele no puede ser tenida en cuenta como en la clasificación convencional.

P-022 PUESTA A PUNTO DE UN NUEVO EQUIPO DE INCUBACIÓN CON TECNOLOGÍA TIME-LAPSE INCORPORADA (MIRI® TL)

I. Cuevas Saiz, C. Olmedo Illueca, JM. Moreno Moya, A. García Belda, N. Díaz Hernández, M. Barea Gómez
Hospital General Universitario de Valencia, Valencia
icuevassaiz@yahoo.es

INTRODUCCIÓN:

Es innegable que uno de los avances más revolucionarios en el terreno de la Fecundación in vitro (FIV) en la última década ha sido la incorporación de la tecnología time-lapse (TL). Actualmente en el mercado podemos encontrar cinco tipos de equipos con dicha tecnología.

Hay dos tipos fundamentales: los que se acoplan a incubadores convencionales o los que son incubadores que trabajan a bajas presiones de oxígeno y con la tecnología time-lapse incorporada. Nuestro grupo, junto con otros 3 grupos europeos, hemos tenido la oportunidad de participar en la puesta a punto del incubador Miri® TL de ESCO Medical.

OBJETIVOS:

El objetivo de este estudio es la validación clínica y adaptación a la rutina de trabajo del nuevo sistema de incubación Miri®TL para la incubación y valoración de la morfología y cinética de los embriones.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Tras la recepción del equipo a nuestro laboratorio, comenzamos a cultivar los embriones resultantes de fecundaciones anómalas (1 y 3 pronúcleos) con el fin de comprobar la viabilidad del mismo como sistema de incubación. Se fueron recopilando las

deficiencias que presentaba el equipo y realizando las correspondientes mejoras en coordinación con el equipo de ingenieros e informáticos de ESCO. Los cambios introducidos afectan a la óptica de la cámara que ofrece las imágenes, al contraste y color de las imágenes, a las placas de cultivo y al software de análisis de datos y generador de informes.

RESULTADOS:

En cuanto a la óptica del equipo, a su recepción incorporaba contraste de fases (20X Zeiss LD-A), lo que hacía bastante complicada la visualización de algunos dismorfismos ovocitarios / embrionarios.

Inicialmente se pensó cambiarla por una Hoffman, pero se optó, con el fin de economizar el equipo, se optó por otra solución, consistente en un cambio en el contraste que es un tipo de reflexión de la luz en una superficie metálica oblicua. La intensidad de la luz no ha sufrido modificaciones y es luz roja led de 635 nm. Otro de los cambios es el aspecto de las imágenes ofrecidas por el equipo, inicialmente con el fondo de color sepia, hecho que hacía que los solapamientos de blastómeras, principalmente en estadio de blastocisto, tuvieran aspecto de focos degenerativos. Finalmente se cambió por un fondo gris que no da lugar a confusiones. Las placas de cultivo embrionarias también se

han modificado. Las placas tienen unos pocillos donde se colocan los embriones. El ángulo de la parte inferior del pocillo se ha cerrado un poco, ya que con el ángulo más amplio, algunos embriones rotaban y quedaban desenfocados del campo de visión. De este modo, aunque se produzcan movimientos del embrión, acotamos la zona de movimiento quedando siempre enfocado. Finalmente se han realizado cambios en el software que incorpora el equipo. A la recepción del equipo, el embriólogo podía marcar en el mismo los eventos cinéticos y sólo dos parámetros morfológicos: asimetría y fragmentación menor o mayor del 10%. Tras los cambios, el software es customizable y cada laboratorio puede registrar en el equipo tanto eventos cinéticos como morfológicos con todas las posibles opciones registradas en su sistema de clasificación embrionaria.

CONCLUSIONES:

El sistema de incubación Miri®TL es adecuado para el cultivo embrionario. Las mejoras introducidas en el equipo hacen que la valoración morfocinética de los embriones cultivados sea sencilla e intuitiva. En la actualidad, el nuevo incubador Miri®TL es un equipo que puede ser utilizado de forma rutinaria en los laboratorios de reproducción asistida, ofreciendo nuevos parámetros que ayudan a una mejor selección embrionaria.

P-023 MEJORA SIGNIFICATIVA DE RESULTADOS REPRODUCTIVOS EN PACIENTES CON BAJA RESPUESTA: LA NUEVA TÉCNICA ¿EMBRYOBANKING?

B. Ramos Mas (1), M. Fernandez (1), E. Rocafort (1), M. Guijarro (1), L. Medrano (1), A. Leza (1), Y. Franco (2), E. Pérez (2), S. Rogel (1), J. Aizpurua (1)
(1) Ivf Spain, Alicante, (2) Ivf Donosti, San Sebastián
b.ramos@ivf-spain.com

INTRODUCCIÓN:

La baja respuesta a partir de una edad determinada (>38) se asocia con bajos resultados en cada ciclo y a menudo son pacientes indicadas para ovodonación. Por otro lado, la calidad ovocitaria está influida por la edad, de manera que pacientes jóvenes con baja respuesta suelen presentar buenas tasas de fecundación y blastocisto, pero limitado número de embriones de calidad. La aplicación de las nuevas tecnologías (biopsia de trofoectodermo, Screening Genético Preimplantacional (PGS), array CGH y vitrificación de blastocistos) permiten la aplicación de nuevas opciones terapéuticas, como podría ser la generación de embriones euploides, aumentando así las opciones reales de embarazo evolutivo. Por otro lado, la acumulación de ovocitos es una opción en pacientes con baja respuesta, pero no determina con precisión la generación de embriones euploides.

OBJETIVOS:

Evaluar si la estrategia de Embryobanking (EB) con PGS puede ser una opción viable en bajas respondedoras en términos de tasa de abandono, transferencia, eficiencia y satisfacción. Comparar dicha estrategia con los resultados obtenidos en

pacientes normo-respondedoras que sólo necesitaron un ciclo de FIV-PGS (FP).

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio comparativo y retrospectivo (enero-2013 a abril-2015) que incluyó 53 pacientes (edad media 39.5 ± 2.3) divididas en dos grupos: 22 bajas respondedoras (número medio de folículos 5.1 ± 1.9) para estrategia EB y 31 alta y normo respondedoras (número medio de folículos 9.5 ± 3.3) para el grupo FP. Con todas las pacientes se utilizó el mismo protocolo antagonista con FSH/LH y maduración final con agonista. Los embriones fueron cultivados, biopsiados y vitrificados desde día 5 hasta día 7. Se utilizó array CGH como técnica de análisis genético. La transferencia fue diferida en todos los casos, empleándose el protocolo sustituido como preparación endometrial.

RESULTADOS:

Ambos grupos fueron comparables en términos de edad y ciclos previos. Se observaron diferencias significativas en el número medio de ovocitos obtenidos por ciclo (7.40 ± 0.70 vs 12.60 ± 2.12 , $p=0.032$). El número medio de ciclos por paciente en el grupo

EB fue 2.75 ± 0.30 . No se observaron diferencias significativas en el número de embriones biopsiados (6.25 ± 1.25 vs 4.50 ± 0.90 ; $p=0.356$) ni en tasa de euploidia (36.05% vs 36.5% ; $p=1$). La tasa de cancelación de transferencia embrionaria fue del 30.5% en el grupo EB frente a un 48.01% en el grupo FP ($p=0.375$). La tasa de embarazo fue ligeramente mayor en el grupo EB, sin embargo no se encontraron diferencias significativas (69.53% vs 66.15% ; $p=1.03$). La tasa de abandono y satisfacción fueron comparables en ambos grupos.

CONCLUSIONES:

Acumular una media de 2.8 ciclos consecutivos en bajas respondedoras equipara las posibilidades de transferir un embrión euploide y la tasa de embarazo de las alta y normo respondedoras de la misma edad. La combinación de PGS en blastocisto y transferencia en diferido elimina el riesgo de perder la ventana de implantación. El abandono, la tasa de cancelación de transferencia y satisfacción fueron similares en ambos grupos, por lo que la baja respuesta ovárica no supone un impedimento para un resultado exitoso tras la aplicación de la técnica de "embryo-banking".

P-024 LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES ECLOSIONADOS TRAS BIOPSIA NO ALTERA SU POTENCIAL DE IMPLANTACIÓN

J. Ten Morro (1), A. Rodríguez Arnedo (1), J. Guerrero Villena (1), MC. Díaz Martínez (1), H. Blanca Ordóñez (1), JA. Ortiz Salcedo (2), B. Lledó Bosch (2), B. Moliner Renau (1), J. Llácer Aparicio (1), R. Bernabéu Pérez (1)
(1) Instituto Bernabeu Alicante, (2) Instituto Bernabeu Biotech, Alicante
jten@institutobernabeu.com

INTRODUCCIÓN:

La incorporación del test cromosómico completo (comprehensive chromosome screening, CCS) realizado mediante hibridación genómica comparada (array-CGH) en el estadio de blastocisto ha supuesto un cambio muy importante en los laboratorios de fecundación in vitro (FIV). Por una parte, la realización de la eclosión asistida (generalmente en día 3) altera el desarrollo normal hasta la fase de blastocisto. La morfología de los embriones es distinta y nos obliga a modificar el sistema de clasificación convencional. Por otra parte, la transferencia de los embriones en fresco se suele demorar un día, hasta tener el diagnóstico cromosómico. Esto hace que muchos de los blastocistos hayan eclosionado completamente y tengan que ser transferidos o vitrificados en día 6 de desarrollo.

OBJETIVOS:

Valorar si existen diferencias en la tasa de implantación en los embriones eclosionados completamente respecto a los que están iniciando la eclosión, en nuestro programa de CCS.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo en el que se incluyeron 163 blastocistos euploides analizados mediante array-CGH, que fueron transferidos a 144 pacientes en el periodo de enero de 2014 a marzo de 2015. El análisis estadístico fue realizado mediante regresión logística binaria. Se tuvo en cuenta como factor de confusión si la transferencia fue en fresco en día 6 (121 embriones), o procedente de ciclos de CCS con congelación y posterior criotransferencia (42 embriones), así como la procedencia u origen de los ovocitos (ovocito propio: 71; ovocito donado: 92). Se empleó el programa estadístico SPSS (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTADOS:

El porcentaje de implantación de los embriones transferidos en proceso de eclosión fue del 49,2% frente al 48,9% de los blastocistos transferidos totalmente eclosionados. No hubieron, por tanto, diferencias estadísticamente significativas (OR:0,836;p=0,627;IC: 0,406-1,721).

CONCLUSIONES:

A pesar de las claras ventajas que aporta el CCS en cuanto a resultados clínicos obtenidos, uno de los aspectos que nos preocupaba enormemente es si los cambios introducidos en el laboratorio de FIV, podían suponer algún tipo de perjuicio, debido a las peculiaridades de estos tratamientos. La transferencia en día 6 de los embriones biopsiados en día 5 hace que muchos de ellos estén eclosionados. Esto supone una desprotección del embrión debido a la pérdida de la zona pelúcida (ZP).

Algunas veces, la manipulación de estos embriones en el momento de la carga en el catéter es más difícil, ya que pueden pegarse al fondo de la placa de transferencia. No obstante, a la luz de estos resultados, podemos concluir que no existen diferencias y que los embriones eclosionados implantan con las mismas opciones que lo hacen aquellos que presentan ZP.

P-025 ONDA CITOPLASMÁTICA Y SIMETRÍA BLASTOMÉRICA AL FINAL DEL CICLO CELULAR Y SU RELACIÓN CON EL RESULTADO CLÍNICO

J. Aguilar Prieto (1), E. Muñoz Muñoz (1), M. Ojeda Varela (1), E. Taboas Lima (1), M. Perez Fernandez (1), A. Kassa (1), L. Sanchez Souto (1), M. Meseguer (2)
(1) IVI VIGO, Vigo, Pontevedra, (2) IVI Valencia, Valencia
E-mail: jesus.aguilar@ivi.es

INTRODUCCIÓN:

Los eventos celulares tempranos han sido estudiados recientemente como

posibles marcadores de selección embrionaria y se ha estudiado su relación con la tasa de implantación. El carácter dinámico de ellos relativiza

su importancia en valoraciones morfológicas estáticas.

OBJETIVOS:

Carcaterizar la onda citoplasmática y la simetría blastomérica al final del estadio de dos y cuatro células en embriones de donantes de ovocitos con implantación conocida.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo observacional realizado en IVI Vigo entre enero de 2011 y enero de 2014. 275 embriones transferidos, cultivados en un incubador Embryoscope en unas condiciones atmosféricas de 37°C, 6% CO₂ y 20% O₂, procedentes de 171 ciclos de donación de ovocitos fueron analizados.

El inicio y final de la onda citoplasmática fue registrada, y su duración calculada como $CW_{duration} = t_{CWend} - t_{CWinitiation}$. $CW_{duration}$ fue categorizada y la al igual que la frecuencia de embriones. La simetría blastomérica fue estudiada al final de los estadios de dos y cuatro células, para evitar cambios en el volume

debido al dinamismo del desarrollo embrionario. Únicamente embriions de implantación conocida, fallo total (KID-) o implantación total (KID+), fueron incluidos en el estudio. Los test de ANOVA t-student y x² se emplearon para analizar la influencia de las variables continuas y categóricas en la tasa de implantación.

RESULTADOS:

275 fueron analizados. CW estuvo presente en todos los embriones, 19.2% de los embriones mostraron una $CW_{duration}$ menor de 1.5h, 58,5% entre 1,5-3h, 19.6% entre 3-4,5h y 2,54% mayor de 4.5h. No se encontraron diferencias significativas entre estas categorías y la tasa de implantación embrionaria. (p=0.13).

En los embriones KID+ la simetría blastomérica fue más frecuente, 33.8% vs 8% (p=0.26) (KID-) al final del estadio de dos células. Las diferencias fueron mayores al estudiarla al final del estadio de las cuatro células, y

estadísticamente significativo 37.09% vs 4,72 (p=0.025).

CONCLUSIONES:

La mayoría de los embriones presentan una CW agrupada en torno a 1,5h y3h, aunque parece que este evento no se encuentra relacionado con implantación embrionaria. La asimetría de las blastómeras al final del estadio de cuatro células se relaciona negativamente con la tasa de implantación, mientras que no lo hace en el estadio de dos células. Aunque el número de embriones analizado es reducido, sugerimos anotar la asimetría blastomérica al final del estadio de dos y cuatro células debido a la continua modificación de las blastómeras embrionarias a lo largo del ciclo celular, haciendo mayor hincapié en la asimetría al final del estadio de 4 células, y considerando esta recomendación para la elaboración de algoritmos de selección embrionaria.

P-026 INCIDENCIA DEL FADING PRONUCLEAR ASINCRÓNICO Y SU RELACIÓN CON EL RESULTADO REPRODUCTIVO.

E. Taboas Lima (1), J. Aguilar Prieto (1), E. Muñoz Muñoz (1), M. Ojeda Varela (1), M. Perez Fernandez (1), A. Kassa (1), L. Suarez Souto (1), M. Meseguer (2)

(1) IVI VIGO, Vigo, Pontevedra, (2) IVI Valencia, Valencia

esther.taboas@ivi.es

INTRODUCCIÓN:

El fading pronuclear es un evento del desarrollo embrionaria temprano que suele ser sincrónico (tanto el pronúcleo masculino y femenino desaparecen al mismo tiempo) de acuerdo con las actuales frecuencias de captura de imágenes de los sistemas de monitorización time-lapse (una imagen cada cinco minutos o más). Ocasionalmente este evento no es sincrónico.

OBJETIVOS:

El propósito del estudio es evaluar la incidencia del fading asincrónico pronuclear en embriones procedentes

de ciclos de ICSI con donación de ovocitos y relacionarlo con parámetros morfocinéticos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo observacional realizado en IVI Vigo. 262 embriones cultivados en un incubador Embryoscope en una atmósfera de 37°C, 6% CO₂ y 20% procedentes de 28 ciclos de donación de ovocitos fueron analizados. Las imágenes de los embriones fueron obtenidas con una frecuencia de 10 minutos en siete planos focales diferentes. El tiempo exacto de los eventos celulares citados más abajo fue evaluado en horas post microinyección espermática.

El fading asincrónico pronuclear (PNf asyn) fue la variable principal analizada. Otros parámetros morfocinéticos, tales como el fading de ambos pronúcleos (tPNf), y el tiempo que tarda el embrión en alcanzar el estadio de dos células (t₂), 3 células (t₃), 4 células (t₄), 5 células (t₅), $cc2=t_3-t_2$ and $s2=t_4-t_3$; Todos estos parámetros fueron relacionados con la clasificación embrionaria ASEBIR. El estadístico T-Student para variables numéricas, y el test de la chi cuadrado para variables categóricas fueron utilizados para el análisis estadístico. Un p-valor menor de 0.05 fue considerado como estadísticamente significativo.

RESULTADOS:

73.28% (192/262) de los embriones procedían de embriones de ciclos en fresco, y 26.72% (70/262) de ovocitos desvitrificados de donante. La tasa de PNF asyn fue de 14.5% (38/262), siendo ligeramente más frecuente en ovocitos descongelados (17.14% vs 13.54%) sin ninguna significación estadística ($p=0.42$). El tiempo medio entre la desaparición del primer y del Segundo pronúcleo fue de 0.33h (IC: 0.17-0.34). La proporción de embriones tipo A en aquellos embriones que presentaban

PNf asyn fue de 34.21% (13/38), y en aquellos con fading pronuclear sincrónico de 48,86%(86/176); $p=0.10$. En embriones con fading asincrónico, tPNf fue significativamente más tarde que en aquellos con fading sincrónico (24.66 ± 4.16 vs 26.56 ± 4.75 , $p<0.0001$), sin embargo, no hubo ninguna otra diferencia significativa en el resto de parámetros morfocinéticos analizados: cc2 (10.83 ± 3.96 vs 11.37 ± 4.75 , $p=0.268$), t5 (50.14 ± 7.88 vs 54.17 ± 7.42 , $p=0.375$) and s2 ($2,61\pm 4.2$ vs 2.97 ± 4.6 , $p=0.475$).

CONCLUSIONES:

La incidencia del fading asincrónico es reducida. Parece ser más frecuente en embriones procedentes de ovocitos descongelados, aunque sin significación estadística. La diferencia entre la desaparición de uno y otro pronúcleo es corta e implica una PNF más tardía, aunque sin incidencia en la calidad del embrión.

P-027 IMPACTO DE LA MULTINUCLEACIÓN EN ESTADIO DE 2 CÉLULAS ANALIZADA POR TIME-LAPSE SOBRE LA TASA DE IMPLANTACIÓN

R. Reus Crespo, S. Cívico Vallejos, M. Guimerà Leal, JM. Calafell Pozo, J. Peñarrubia Alonso, J. Balasch Cortina
Hospital Clínic, Barcelona
reusrebeca@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

La selección del embrión con mayor potencial de implantación es uno de los grandes retos de la embriología. La multinucleación, definida como la presencia de más de un núcleo por blastómero, se ha relacionado con un aumento en las tasas de aneuploidía y una disminución en las tasas de implantación y de recién nacido vivo (1,2). Actualmente, las sociedades científicas (3) recomiendan evaluar la multinucleación en estadio de 4 células (44 ± 1 horas post-inseminación). No obstante, gracias a la tecnología time-lapse, se ha observado que la multinucleación en estadio de 2 células es más frecuente que en estadio de 4 células. La relevancia de este hallazgo es todavía un tema controvertido.

OBJETIVOS:

Los objetivos de este estudio son: 1) evaluar la incidencia de la multinucleación en los estadios de 2 y 4 células, 2) analizar el porcentaje de embriones mononucleados en estadio de 4 células que presentan multinucleación en estadio de 2 células

y 3) valorar la relevancia clínica de estos parámetros en la implantación.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo de 106 ciclos de FIV realizados entre marzo de 2014 y marzo de 2015 en los que se ha utilizado un incubador con tecnología time-lapse (Embryoscope®). Se incluyen en el estudio un total de 204 embriones de implantación conocida (known implantation data, KID), de los cuales, 96 dieron lugar a un saco gestacional (KID+) y 108 no implantaron (KID-). Se analizó la multinucleación en los embriones de 2 y 4 células en cada grupo (KID+/KID-). El análisis estadístico se realizó mediante el test χ^2 ($p<0.05$).

RESULTADOS:

El 54,2% ($n=52$) y el 16,7% ($n=16$) de los embriones KID+ presentaron al menos una célula multinucleada en estadio de 2 células y de 4 células, respectivamente. En el grupo de embriones KID-, se observaron blastómeros multinucleados en el 58,3% ($n=68$) y el 24,1% ($n=26$) de los embriones en estadio de 2 y 4 células respectivamente. El 29,2%

($n=28$) de los embriones KID+ y el 33,3% ($n=36$) de los KID- tuvieron al menos un blastómero multinucleado en estadio de 2 células y no presentaron ninguna en estadio de 4 células. Estos resultados se corresponden con los publicados en trabajos similares. A pesar de que la incidencia de multinucleación es mayor en el grupo KID-, las diferencias observadas en la tasa de multinucleación en los estadios de 2 y 4 células y en la tasa de multinucleadas en estadio de 2 células que son mononucleadas en estadio de 4 células no fueron estadísticamente significativas.

CONCLUSIONES:

La multinucleación observada en estadio de 2 células parece transitoria y no siempre asociada a aneuploidía (4). En nuestro estudio, la multinucleación en estadio de 2 células no influye en las tasas de implantación. No obstante, es necesario ampliar este estudio con un mayor número de casos en los que se analicen estos parámetros y su relación con la dotación cromosómica de los embriones. El estudio de un mayor número de embriones con implantación

conocida nos permitiría asimismo confirmar la repercusión sobre la implantación de la multinucleación en estadio de 4 células (no significativa en este estudio).

BIBLIOGRAFÍA:

Ergin EG, Çali kan E, Yaçinkaya E, Öztel Z, Çökelez K, Özay A, Özörnek HM. Frequency of embryo multinucleation detected by time-lapse system and its impact on pregnancy

outcome. *Fertil and Steril* 2014;102(4): 1029-1033.e1.

Desai N, Ploskonka S, Goodman LR, Austin C, Goldberg J, Falcone T. Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles. *Reprod Biol Endocrinol* 2014; 12:54.

Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group

Embryology. Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod* 2011;26 (6):1270-1283.

Staessen C, Van Steirteghem A. The genetic constitution of multinuclear blastomeres and their derivative daughter blastomeres. *Hum Reprod* 1998;13(6):1625-1631.

P-028 VALORACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE UN MEDIO DE CULTIVO POSTCOMPACTACIÓN EN LA MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS

LM. García Valverde (1), I. Peinado Casas (2), P. Torres Gómez (2), MJ. Gómez Torres (3), A. Monzó Miralles (3), M. De la Orden Rodríguez (3), J. Aizpurua Sáenz (1), C. Díaz García (3)
(1) IVF Spain, Alicante. (2) Reproducción Humana. Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia. (3) Departamento Biotecnología. Universidad de Alicante, Alicante
lmgv25@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

La maduración in vitro (MIV) de ovocitos es una técnica interesante y en continuo desarrollo dentro de los tratamientos de Reproducción Asistida. Actualmente existen medios comerciales de MIV que presentan razonables tasas de maduración. No obstante, se sigue investigando con el fin de conseguir un medio de cultivo que mejore las tasas de maduración, tanto nuclear como citoplasmática. La maduración ovocitaria requiere determinados metabolitos energéticos para la vía glucolítica, los cuales están presentes en los medios de cultivo a blastocisto; ésto refuerza la hipótesis de la eficacia de este tipo de medio para la MIV.

OBJETIVOS:

Comparar la eficacia de un medio de MIV comercial vs un medio de cultivo para blastocisto suplementado.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se utilizaron ovocitos inmaduros en estadio de profase I (PI) obtenidos tras

la realización de un ciclo de: Fecundación In Vitro (FIV) por microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) o Preservación de la Fertilidad en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe. La inclusión de los ovocitos mediante la firma del consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética Humana del Hospital.

Estudio de cohortes prospectivo en el que se recogieron los datos de 649 ovocitos humanos profase I. Los PI fueron asignados aleatoriamente a uno de los dos grupos de este trabajo. G1: SAGE IVM media (n=225), y G2: CCM Vitrolife suplementado con SSS y hMG (n=424). La randomización se realizó mediante una tabla de números aleatorios para los dos grupos objeto de estudio.

RESULTADOS:

Se obtienen diferencias significativas en las tasas de MIV tras 24 horas de cultivo al comparar los dos grupos de estudio: G1=64,9% vs G2=78,8%; p=0,042. La presencia o no de células de

la granulosa residuales en los ovocitos tras su decumulación no afectó la maduración de los mismos.

CONCLUSIONES:

El medio de cultivo a blastocisto suplementado adecuadamente puede ser una buena alternativa a los medios de MIV comerciales disponibles. Estudios prospectivos son necesarios para comprobar si se obtienen similares resultados en ovocitos PI procedentes de pacientes no estimuladas hormonalmente.

BIBLIOGRAFÍA:

Comparison of blastocyst and Sage media for in vitro maturation of human immature oocytes. Pongsuthirak P. et al. *Reprod Sci.* 2015 Mar;22(3):343-6
Comparison of in vitro maturation media of immature oocytes: the effectiveness of blastocyst culture media. Kim M. et al. *Fertil Steril.* 2011 Feb;95(2):554-7. doi:

P-029 EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LOS COFACTORES DE TUBULINA EN GAMETOS HUMANOS

V. Jiménez Moreno (1), E. Agirregoitia Marcos (2), L. García Hevia (3), J. Villegas Sordo (3), M. López Fanarraga (3)
(1) Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander. (2) Facultad de Medicina de la Universidad del País Vasco, (3) Facultad de Medicina-IDIVAL de la Universidad de Cantabria
victoriaj12001@yahoo.es

INTRODUCCIÓN:

Los microtúbulos (MTs) son estructuras tubulares formadas por la unión no covalente de heterodímeros de α - y β -tubulina. Para que tenga lugar el ensamblaje del heterodímero, así como su incorporación al MT, es necesaria la presencia de proteínas denominadas cofactores de la tubulina (TBCs).

Dichos MTs son importantes en la formación y diferenciación de los gametos humanos ya que están involucrados en procesos como la separación de las cromátidas, el transporte intracitoplásmico y el ensamblaje y mantenimiento de flagelos. Además, también participan durante la fecundación en la aproximación de los pronúcleos y formación del centrosoma del embrión. Aun así, aunque se sabe que el papel de los TBCs es esencial para el buen funcionamiento de los MTs, poco o nada se sabe de la presencia y del papel de estos cofactores de la tubulina en los gametos humanos.

OBJETIVOS:

Detectar dos de los cofactores más importantes, TBCD y TBCE, en espermatozoides humanos e investigar en profundidad la distribución de los mismos en los diferentes estadios de la reanudación meiótica en ovocitos humanos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Este estudio ha sido llevado a cabo con espermatozoides y ovocitos donados por pacientes del programa de reproducción asistida (IVF/ICSI) de la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Se analizaron espermatozoides de 204 pacientes y ovocitos de 142 pacientes. La presencia de los TBCs se analizó usando diferentes técnicas de investigación: RT-PCR, inmunoblotting e inmunocitoquímica.

RESULTADOS:

El análisis del Western blot revela la presencia de las proteínas TBCD y TBCE en espermatozoides y en ovocitos humanos. La localización subcelular de TBCD y TBCE en espermatozoides es centrosomal y pericentrosomal respectivamente. En los ovocitos, ambos cofactores se encuentran en el citoplasma en forma de gránulos durante los diferentes estadios de la maduración ovocitaria. Los resultados de la PCR demuestran la existencia del transcripto de TBCD y TBCE en los tres estadios de maduración ovocitaria pero no están presentes en los espermatozoides del eyaculado.

CONCLUSIONES:

En este estudio se determina por primera vez la presencia de los cofactores de la tubulina D y E en espermatozoides y ovocitos humanos. Este hecho sugiere una posible acción de los cofactores en los procesos de gametogénesis y por tanto en el proceso reproductivo.

P-031 EVALUACIÓN DEL DAÑO EN ADN DE LAS CÉLULAS DEL CUMULUS Y SU RELACIÓN CON EL ÉXITO EMBRIONARIO TRAS ICSI: ESTUDIO PILOTO

M. Dorado Silva (1), C. López Fernandez (2), C. Corral Vázquez (1), P. Sánchez Martín (3), J. Gosálvez (3)
(1) Fundación Ginemed, Sevilla. (2) Universidad Autónoma de Madrid, Unidad de Genética, Departamento de Biología. Madrid. (3) Clínicas Ginemed, Sevilla
mdorado@ginemed.es

INTRODUCCIÓN:

El posible daño que se registra en las Células del Cumulus (CCs) en ovocitos obtenidos tras estimulación ovárica que se utilizarán para técnicas de

reproducción asistida, puede guardar una relación directa con el desarrollo embrionario tras la fertilización. En los últimos años se han propuesto una serie de biomarcadores, mayoritariamente relaciones con poblaciones de ARNs,

que podrían ser indicativos del estado de calidad ovocitaria. Sin embargo, el bajo número de células que se pueden rescatar asociadas a cada ovocito supone un serio problema a la hora de establecer correlaciones directas

entre "calidad" de las CCs y viabilidad embrionaria. Recientemente se ha establecido una técnica sencilla, basada en el test de dispersión de la cromatina, que permite evaluar el daño en el ADN presente en las CCs, incluso cuando su número es muy reducido, para establecer correlaciones con la calidad embrionaria obtenida tras la fertilización con ICSI.

OBJETIVOS:

Establecer una posible correlación entre el daño observado en las CCs obtenidas de ovocitos individualizados y el desarrollo embrionario post-fertilización tras ICSI.

MATERIAL Y MÉTODOS:

En el estudio preliminar, se incluyeron las CCs de 43 ovocitos procedentes de 8 mujeres que se estimularon con la pauta combo con gonadotropinas urinarias altamente purificadas y FSH recombinante. El proceso se finalizó con antagonistas y hCG recombinante. Las CCs, una vez separadas de cada ovocito individualizado, se procesaron con el kit (D3-Max; Halotech DNA, Madrid).

RESULTADOS:

Las CCs afectadas por un nivel de daño elevado en su ADN, muestran unos halos de dispersión de la cromatina de gran tamaño, donde el radio del halo es mayor que el del "core" que genera tras el proceso de desproteización

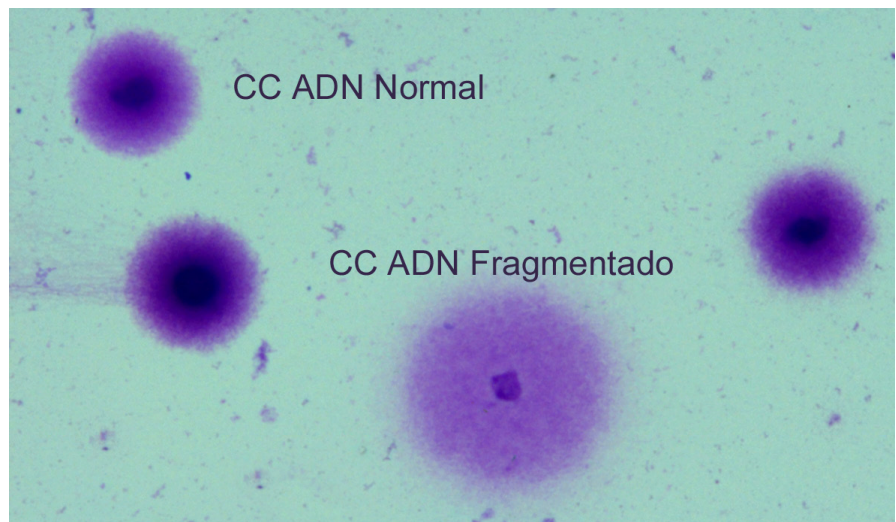
controlada. Por el contrario, las células que muestran un halo cuyo radio es menor o igual que el del "core", se consideran células con su ADN no afectado.

Aquellos embriones catalogados como calidad A o B según criterios de ASEBIR mostraron una fragmentación por debajo del 15%, en cambio, los embriones de mala calidad (C y D), presentaron una fragmentación por encima del 20%. Los valores más elevados de daño en las CCs se obtuvieron en ovocitos que sufrieron fallos de fertilización o bien que degeneraron tras la ICSI (daño superior al 25%).

CONCLUSIONES:

Si bien los niveles de corte para el daño en las CCs sugeridos en este

estudio piloto son provisionales, el estudio de los niveles de daño en las CCs, se muestra como una estrategia de innegable valor diagnóstico para pronosticar el posible destino del embrión tras la fertilización. Debido a que la técnica de diagnóstico del nivel de daño en las CCs es relativamente corta -15 min por cada 8 muestras de CCs- una vez separadas las CCs de cada ovocito, si la tendencia aquí observada se corrobora al incrementar el tamaño de la muestra, se podrían descartar a priori determinados ovocitos antes de ser fertilizados. El estudio del daño en las CCs, puede tener una gran proyección para asegurar la calidad de los ovocitos que se vitrifican y que serán utilizados en los programas de ovo-donación.



P-032 COMPLICACIONES PERINATALES Y MALFORMACIONES CONGÉNITAS EN NIÑOS CONCEBIDOS GRACIAS AL USO DE TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA: ESTUDIO DE COHORTE PROSPECTIVO

MJ. Sánchez Soler (1), J. Gálvez Pradillo (2), V. Pérez Fernández (3), MC. Martínez Romero (4), V. López González (5), MJ. Ballesta Martínez (5), J. Álvarez Castillo (6), A. Nieto Díaz (7), M. Sánchez Solís (8), E. Guillén Navarro (9)

(1) Sección de Genética Médica, Servicio de Pediatría. Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA), El Palmar, Murcia (2) Unidad Reproducción, Servicio de Ginecología y Obstetricia. HCUVA, Murcia (3) Universidad de Murcia, Murcia, (4) Centro de Bioquímica y Genética Clínica, HCUVA. IMIB-Arrixaca, Murcia, (5) Sección Genética Médica, Servicio de Pediatría, HCUVA. IMIB-Arrixaca. CIBERER Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras ISCIII Madrid., (6) Unidad de Reproducción. Servicio de Ginecología y Obstetricia, HCUVA, (7) Servicio de Ginecología y Obstetricia, HCUVA, (8) Servicio de Pediatría, HCUVA, (9) Sección Genética Médica, Servicio de Pediatría, HCUVA. IMIB-Arrixaca. CIBERER Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras ISCIII Madrid. Cátedra de Genética, UCAM. Murcia

mj.sanchezsoler@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

Más de 5 millones de niños han sido concebidos gracias al uso de técnicas de reproducción asistida (TRA) a nivel mundial desde 1978. Múltiples estudios se han realizado en relación con el estado de la salud de estos niños, pero los resultados son controvertidos en ocasiones por los múltiples factores de confusión asociados (edad materna avanzada, tipo de infertilidad, etc.).

OBJETIVOS:

Determinar en una cohorte de gestaciones clínicas conseguidas mediante TRA, la frecuencia y causas de aborto, prevalencia de complicaciones perinatales, presencia de malformaciones congénitas (MC) en los nacidos vivos al año de vida y describir posibles factores asociados.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Cohorte de gestaciones clínicas de mujeres tratadas entre mayo 2012-febrero 2013 en la Unidad de Reproducción en un Hospital Terciario del Sistema Público. Recogida de datos epidemiológicos, tipo y tiempo de infertilidad, tipo de técnica, día (D) de transferencia embrionaria y datos evolutivos de la gestación. Evaluación al año de edad de RN vivos, recogida de datos perinatales y descripción de la presencia o no de MC mayores y menores.

RESULTADOS:

109 gestaciones clínicas: 13 abortos

(12%) [9 espontáneos, 2 ectópicos, 1 ILE (T21) y 1 corioamnionitis] y 96 gestaciones evolutivas, de ellas el 26% fueron gestaciones múltiples (GM). De 121 RN vivos, 107 fueron evaluados al año de edad (participación 88%). El 20% fueron prematuros (ningún caso nació antes de la semana de gestación 31), y el 18% precisó ingreso al nacer. Peso al nacimiento medio: 2900 g (p40). Evaluación al año de edad: once (10%) presentaron MC mayores: cardiopatía congénita lo más frecuente (7), malformación del sistema nervioso (2) e hidronefrosis congénita (1). El 53% (56) presentaron MC menores, las más frecuentes las anomalías pigmentarias, malformación capilar y paladar ojival. Destaca que solo el 48% tomó ácido fólico preconcepcional.

En el análisis comparativo se observaron diferencias significativas (DS; $p < 0.05$): mayor edad materna, mayor frecuencia de infertilidad femenina y de transferencia embrionaria el D2 en el grupo de abortos; menor frecuencia de infertilidad femenina y mayor de transferencia embrionaria en D5/D6 en el grupo de MC mayores y mayor frecuencia de gemelaridad en el grupo de MC menores y de prematuros. No se detectaron diferencias significativas en cuanto al tipo de técnica, toma de ácido fólico preconcepcional ni edad paterna.

CONCLUSIONES:

La frecuencia de abortos en esta cohorte es similar a la presente en población general (12%) y se ha asociado a mayor edad materna, infertilidad femenina

y transferencia precoz del embrión. La frecuencia de MC mayores es mayor a la esperada (10%), detectándose mayor tasa de transferencia tardía de embrión, lo que sugiere posible influencia del cultivo. Las MC menores son muy frecuentes, así como la prematuridad, pero la mayor tasa de gemelaridad puede ser un factor de confusión. No se puede descartar que la baja tasa de gestantes que tomaron ácido fólico preconcepcional, pueda interferir en los resultados.

BIBLIOGRAFÍA:

1. J. De Mouzon et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2007: results generated from European registers by Consortium for the European society on Human Reproduction and Embryology (ESHRE). *Human Reproduction*, Vol.27, No.4 pp 954-966, Feb 2012.
2. McDonald SD et al, Preterm birth and low birth weight among in vitro fertilization singletons: a systematic reviews and metaanalyses. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2010.
3. Mansoureh Farhangniya et al. Comparison of Congenital Abnormalities of Infants Conceived by Assisted Reproductive Techniques versus Infants with Natural Conception in Tehran. *Int J Fertil Steril*. 2013.
4. Fedder J et al. Neonatal outcome and congenital malformations in children born after ICSI with testicular or epididymal sperm: a controlled national cohort study. *Human Reproduction*, 2013.

P-033 EFICACIA DE LA SELECCIÓN ESPERMÁTICA POR COLUMNAS DE ANEXINAS (MACS) Y EL EFECTO DE LA APOPTOSIS EN RESULTADOS REPRODUCTIVOS

R. Lafuente Varea (1), G. López (1), K. Lattes (1), D. García (2), R. Vassena (3), M. Brassesco (1)

(1) CIRH. Barcelona, (2) Fundació EUGIN. Barcelona, (3) Clínica EUGIN. Barcelona

rlafuente@cirh.es

INTRODUCCIÓN:

La apoptosis es un proceso ordenado de muerte celular ante estímulos extra o intracelulares. La célula en apoptosis comienza externalizando fosfolípidos de membrana que pueden ser reconocidos por la anexina-V, hay una activación de las caspasas, y finalmente se produce la fragmentación del ADN. La utilización de espermatozoides apoptóticos en un tratamiento de Reproducción Asistida podría causar efectos adversos en el resultado. Una selección de espermatozoides no unidos a la anexina-V mediante microesferas magnéticas (MACS) permite enriquecer poblaciones espermáticas sin apoptosis, y podría mejorar los resultados reproductivos en aquellos pacientes con elevada apoptosis temprana en semen.

OBJETIVOS:

El objetivo de este estudio retrospectivo (n=83) es determinar la relación entre la proporción de espermatozoides en apoptosis temprana en la muestra y resultados reproductivos tras ICSI.

MATERIAL Y MÉTODOS:

A todos los pacientes se realizó un análisis de nivel de apoptosis y vitalidad (Anexina V-FITC y IP, Milteniy Biotec), y fragmentación del ADN (SCSA) mediante citometría de flujo (MACSQuant Analyzer, Milteniy Biotec) en tres momentos: semen en fresco, después de la capacitación por gradientes de densidad, y después de la selección mediante MACS (Milteniy Biotec). Por falta de valores de referencia en la literatura, los pacientes se dividieron en 2 grupos tras calcular la mediana del % apoptosis post-capacitación: Grupo I: n=41, <16% de apoptosis. Grupo II: n=42, ≥16% de apoptosis. Se compararon los resultados reproductivos entre

los dos grupos: tasa de fecundación, calidad de los embriones generados, tasa de aborto y de embarazo en la primera transferencia embrionaria. Según el comportamiento de la variable a analizar, se realizó t-Student, prueba U de Mann-Whitney o Chi-Cuadrado ($p < 0,05$. SPSS, 19.0).

RESULTADOS:

Tanto el Grupo I como el Grupo II no presentaban diferencias en la edad del hombre ($38,0 \pm 4,94$ vs $37,9 \pm 4,16$), y de la mujer ($37,0 \pm 3,36$ vs $36,6 \pm 4,10$). El seminograma del Grupo I presentaba diferencias significativas respecto al Grupo II en concentración espermática ($103,8 \pm 96,04$ vs $51,0 \pm 59,05$, $p=0,001$), movilidad progresiva ($45,8 \pm 21,79$ vs $30,5 \pm 14,67$, $p < 0,001$), % apoptosis total ($23,89 \pm 10,15$ vs $34,0 \pm 12,48$, $p < 0,001$) y % fragmentación del ADN ($21,9 \pm 9,93$ vs $29,4 \pm 8,01$, $p=0,000$) en la muestra fresca. No obstante, el % de apoptosis en células vivas en fresco no presentaba diferencia entre los grupos ($11,6 \pm 6,43$ vs $14,3 \pm 10,57$, $p=0,395$). Ni en el Grupo I ni en el Grupo II había diferencia entre % de apoptosis en células vivas después de gradiente de densidad y después de gradiente + MACS ($p=0,570$ y $p=0,108$), aunque en el Grupo II respecto la % de fragmentación del ADN bajó de forma significativa ($p < 0,001$). No se detectó diferencias entre Grupo I y Grupo II en tasa de fertilización ($66,3 \pm 21,95$ vs $70,3 \pm 22,56$, $p=0,416$), % de embriones de grado A+B ($26,0 \pm 23,47$ vs $39,1 \pm 30,37$, $p=0,05$), % de embriones no evolutivos ($29,2 \pm 22,64$ vs $22,7 \pm 21,76$, $p=0,212$), tasa de embarazo ($43,2\%$ vs $43,9\%$, $p=0,953$) y aborto en el primer trimestre ($4,3\%$ vs $9,1\%$, $p=0,524$).

CONCLUSIONES:

En los pacientes estudiados, la apoptosis total en el semen capacitado

>16% se relaciona con una disminución significativa de la calidad seminal. Sin embargo, la capacitación de la muestra mediante gradiente de densidad de por sí desecha células apoptóticas, mayoritariamente células inmóviles o necróticas. La tasa de células apoptóticas en el semen después de la capacitación no mejora al realizar una ulterior selección mediante MACS, aunque sí mejora el nivel de fragmentación del ADN. En conclusión, una selección para espermatozoides vivos sin apoptosis no parece mejorar los resultados reproductivos de forma significativa.

BIBLIOGRAFÍA:

- Romany L, Garrido N, Motato Y, Aparicio B, Remohí J, Meseguer M. Removal of annexin V-positive sperm cells for intracytoplasmic sperm injection in ovum donation cycles does not improve reproductive outcome: a controlled and randomized trial in unselected males. *Fertil Steril*. 2014 Dec;102(6):1567-75.

- Vendrell X, Ferrer M, García-Mengual E, Muñoz P, Triviño JC, Calatayud C, Rawe VY, Ruiz-Jorro M. Correlation between aneuploidy, apoptotic markers and DNA fragmentation in spermatozoa from normozoospermic patients. *Reprod Biomed Online*. 2014 Apr;28(4):492-502.

- Gil M, Sar-Shalom V, Melendez Sivira Y, Carreras R, Checa MA. Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet*. 2013 Apr;30(4):479-85. doi: 10.1007/s10815-013-9962-8. Epub 2013 Mar 7. Review.

- Sharbatoghli M, Valojerdi MR, Amanlou M, Khosravi F, Jafar-abadi MA. Relationship of sperm DNA fragmentation, apoptosis and dysfunction of mitochondrial membrane

potential with semen parameters and ART outcome after intracytoplasmic sperm injection. Arch Gynecol Obstet. 2012 Nov;286(5):1315-22

P-034 PRESENCIA DE ANIONES SÚPER-OXIDO EN EL EYACULADO Y SU RELACIÓN CON LA LONGEVIDAD DEL ADN ESPERMÁTICO EN MUESTRAS MANEJADAS IN VITRO

C. Alonso Muriel (1), M. Lara Lara (1), B. Buch Tomé (1), C. Segura Garcia (1), R. Garnica Sarria (1), J. Gosalvez Berenguer (2), C. López Fernández (2)

(1) Laboratorio de Reproducción Centro Gutenberg, Málaga, (2) Unidad de Genética, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
calonso@urecentrogutenberg.com

INTRODUCCIÓN:

Numerosos estudios han demostrado la presencia de altos niveles de estrés oxidativo (EO) en el semen. El EO puede afectar a la integridad del ADN espermático causando lesiones en esta molécula y que se relacionan con el potencial de fertilidad el varón.

La fragmentación del DNA espermático (SDF) hay que considerarlo como un concepto dinámico, ya que los valores de SDF tienden a aumentar con el tiempo; es decir existe una variación dinámica del daño cuando las muestras seminales se manejan ex vivo.

OBJETIVOS:

El objetivo de este trabajo es analizar la posible influencia del estrés oxidativo generado por un exceso de aniones Super-Oxido (SOx) en el eyaculado, en la dinámica de fragmentación del DNA espermático.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio prospectivo de 138 muestras de eyaculado de pacientes en estudio de fertilidad. Los niveles de SOx se realizaron mediante el test Oxi-Sperm (Halotech DNA), el cual se basa en la utilización de un gel reactivo capaz de reaccionar con el anión SOx cuando éste no está re-equilibrado por la acción de la

enzima SOx-Dismutasa. En función de la concentración de SOx reactivo, se forma un precipitado de color variable desde el rosa al morado, que define el grado de estrés oxidativo de la muestra. Para el análisis de la dinámica de fragmentación del DNA usamos la técnica de dispersión de la cromatina espermática (SCD) con el kit Halosperm (Halotech) en 4 tiempos : recién eyaculado (t0), 2 horas (t2), 6 horas (t6) y 24 horas (t24) tras eyaculación. Para ello incubamos las muestras seminales en estufa a 37°C. Las muestras fueron clasificadas en cuatro grupos según el nivel de EO: N1: no se detecta EO, N2: nivel bajo de EO, N3: nivel medio de EO, y N4: nivel alto de EO.

RESULTADOS:

24 muestras (17%) fueron N1, 75 muestras (54 %) N2, 34 muestras (25 %) N3 y 5 muestras (4%) N4.. Las medias de fragmentación de tiempo basal de los diferentes grupos fueron: N1: 19.6, N2: 24.3, N3: 22.6, N4: 19. Las medias de velocidad de fragmentación en las primeras 6 horas de incubación fueron: N1:2.6, N2:3.1, N3:3.3, N4:5.2.

CONCLUSIONES:

Los niveles de SDF evaluados a t0 no mostraron diferencias significativas en los diferentes grupos. Por el contrario, sí que se observó una tendencia positiva

hacia un aumento de la velocidad de fragmentación en las primeras seis horas de incubación, por lo que podemos concluir que la presencia SOx en el plasma seminal parece no influir en el índice de fragmentación del ADN espermático basal pero sí en la velocidad de fragmentación del DNA. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se aconseja que en aquellas muestras seminales que presenten un grado alto de presencia de SOx, éstas sean procesadas de forma inmediata para su posterior uso en técnicas de reproducción asistida.

BIBLIOGRAFÍA:

Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasi H, Tanak T. Increased deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. Fertil Steril 1997;65:519-524.

Meseguer M, Martínez-Conejero JA, O'Connor JE, Pellicer A, Remoh J, Garrido N. The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study a male infertility prognostic factor. Fertil Steril 2008;89:1191-1199.

Aitken RJ, De Iuliis GN, McLachlan RI. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. Int J Androl 2009;32:46-56.

P-035 INFLUENCIA DE LA EDAD DEL VARON EN EL INDICE DE FRAGMENTACION DEL DNA DE LOS ESPERMATOZOIDES.

M. Lara Lara, B. Buch Tomé, C. Segura García, R. Garnica Sarría, M. Martínez Moya, C. Alonso Muriel
 Unidad de Reproducción, Centro Gutenberg, Málaga
mlara@urecentrogutenberg.com

INTRODUCCIÓN:

Aproximadamente un 15% de las parejas son infértiles y más de una cuarta parte de los casos de infertilidad se atribuyen a factor masculino. Se sabe que la edad materna es uno de los factores pronóstico principales en fertilidad y también en los tratamientos de Reproducción Asistida. En la literatura, además, se describe que la fertilidad masculina y la calidad seminal también disminuyen con el aumento de edad del varón. Por otro lado, los cambios socioculturales que hacen retrasar la maternidad en la mujer, influyen igualmente en el varón. En este sentido, no existen datos concluyentes respecto a la influencia de la edad en la reproducción del varón.

OBJETIVOS:

Evaluar el efecto negativo de la edad paterna en la integridad de DNA de los espermatozoides.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo de 212 muestras de semen de pacientes en estudio de fertilidad.

Las muestras se dividieron en tres grupos en función de la edad del varón, menores de 35 años (Grupo 1), entre 35 y 45 años (Grupo 2), y mayores a 45 años (Grupo 3).

Como objetivo principal de estudio se evaluó el índice de fragmentación (IF) en todos los grupos mediante el test de dispersión de la cromatina (SCD).

En cada grupo a su vez se dividieron los pacientes entre los que tenían un índice de fragmentación normal ≤ 29 o alterado >29 .

Se excluyeron del estudio los pacientes con varicocele grado II-III.

Se valoró distribución de porcentajes de pacientes con IF normal y alterado comparando todos los grupos, valorando diferencias entre grupos mediante test Chi2 ($p < 0.05$), y valorando Odds Ratio (OR) con IC95.

RESULTADOS:

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de pacientes con un IF alterado entre grupo 1 (32.65%) y grupo 3 (60%) con $p=0,024$ y $OR=3.1$ (IC95%=1,1-8,4); y entre grupo 2 (34.05%) y grupo 3 (60%) con $p=0,014$ y $OR=2,9$ (IC95%=1,2-7.0).

CONCLUSIONES:

Los resultados del estudio confirman el efecto negativo del aumento de la edad paterna sobre la integridad del DNA de los espermatozoides. Estos resultados justifican la aplicación clínica de los

test de integridad del DNA en pacientes varones mayores de 45 años, de manera que en los casos donde el paciente tenga un IF alterado se puedan desarrollar estrategias que lo disminuyan como tratamiento con antioxidantes, uso de columnas de Anexina, etc.

BIBLIOGRAFÍA:

- Stephanie B. et al. Sperm deoxyribonucleic acid damage in normozoospermic men is related to age and sperm progressive motility. *Fertility and Sterility*, Vol. 101, Issue 6, p1588-1593. March 31, 2014.
- Sergey I. et al. Age-related decline in sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male infertility. *Fertility and Sterility*, Vol. 85, Issue 2, p496-499, February 2006.
- Kathryn C. et al. Role of increased male age in IVF and egg donation: is sperm DNA fragmentation responsible? *Fertility and Sterility*, Vol. 99, Issue 1, p30-36 January, 2013.
- T.E. Scmid et al. The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers *Hum. Reprod.* (2007) 22 (1): 180-187.
- H.E. Duran et al. Impact of male age on the outcome of oocyte donation cycles. *Fertility and Sterility*, September 2008.

	Grupo 1 (< 35 años)	Grupo 2 (35-45 años)	Grupo 3 (> 45 años)
Nº pacientes	49	138	25
IF normal	33	91	10
IF Alterado	16	47	15
% IF alterado	32.65%	34.05%	60%

P-036 PRESENCIA DE VIH EN SEMEN EN PACIENTES VIH+ EN MONOTERAPIA CON DARUNAVIR/RITONAVIR

ML. López Regalado(1), MC. Gonzalvo López(1), A. Clavero Gilabert(1), M. Luengo Diaz(1), P. Navas Bastida(1), I. Sánchez Castello(1), A. Guzmán Olmedo(1), L. Martínez Granados(1), J. Fontes Jiménez(1), J. Mozas Moreno(1), MA. López Ruz(2)
(1)Unidad de Reproducción. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada. (2) Unidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada
marisalopezregalado@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

Los pacientes VIH adherentes al tratamiento antirretroviral en triterapia alcanzan en más del 90% una carga viral en plasma sanguíneo indetectable, lo que se considera un control excelente. Diversos estudios avalan que estos pacientes con carga viral indetectable y sin enfermedades de transmisión sexual no transmiten el virus vía sexual.

Sin embargo son pocos los trabajos que estudian la carga viral en líquido seminal en pacientes en monoterapia con inhibidores de la proteasa.

OBJETIVOS:

Evaluar los cambios producidos en la carga viral del líquido seminal en pacientes VIH que estando en tratamiento con triple terapia, inician monoterapia con darunavir/ritonavir.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio observacional con pacientes VIH, con carga viral indetectable en

plasma sanguíneo en tratamiento con triple terapia que incluye 2 análogos de nucleós(t)idos y que son subsidiarios de pasar a monoterapia con un inhibidor de la proteasa potenciado. Los criterios de inclusión fueron los siguientes: pacientes varones con carga viral plasmática indetectable (< 20 copias) en triterapia que incluya análogos y mayores de 18 años que den su consentimiento informado por escrito. Las variables analizadas fueron: edad, tipo de triterapia y copias RNA VIH mL en líquido seminal y plasma. En cada paciente se analizan dos muestras de semen separadas 15 días, antes de abandonar el tratamiento con triterapia, y otras dos muestras tras 48 semanas de estar en tratamiento con monoterapia de darunavir/ritonavir. La determinación de la carga viral se realiza en líquido seminal, éste se separa en dos fracciones mediante centrifugación a 300g durante 10 min. La técnica utilizada para cuantificar RNA VIH-1, en la muestra final procesada es PCR a tiempo real, un ensayo adaptado de VIH-1 COBAS Ampliprep/Taqman assay.

RESULTADOS:

Se incluyeron un total de 28 pacientes, la edad media fue de $41 \pm 9,13$ años (22-55). El resultado de carga viral positiva en líquido seminal en pacientes con triterapia en la primera muestra de semen fue del 14,81% (4/27), oscilando entre 35 y 1210 copias/ml. El resultado de carga viral positiva en líquido seminal en pacientes con triterapia en la segunda muestra fue del 4,55% (1/22) con 399 copias/ml. El total de muestras de semen positivas en monoterapia con darunavir/ritonavir fue del 3,13% (1/17 pacientes con carga viral positiva de 139 copias/ml) en la primera muestra y 0/15 pacientes con carga viral positiva en la segunda muestra. No se observó relación entre la presencia de VIH en semen y el tipo de triterapia.

CONCLUSIONES:

La monoterapia con darunavir/ritonavir es tan segura como la triterapia en relación a la presencia de VIH en semen.

P-037 ¿AYUDA EL SCREENING GENÉTICO DE ANEUPLOIDÍAS (PGS) POR ARRAY-CGH A MEJORAR LOS RESULTADOS EN PACIENTES DE OVODONACIÓN CON FISH DE ESPERMATOZOIDES PATOLÓGICO?

N. Almunia Santiago (1), I. Torres González (1), J C. García Torón (1), A M. Villaquirán Villalva (1), E. Fernández García (2), Á. Gómez Duro (2), E. Gómez Sánchez (1)
(1) Tahe Fertilidad, Murcia. (2) Geniality, Madrid
nuria.almunia@tahefertilidad.es

INTRODUCCIÓN:

Desde hace años se ha popularizado el estudio de la dotación cromosómica de los espermatozoides por medio de la fluorescencia con hibridación in situ (FISH) de al menos 5 cromosomas, encontrándose una clara relación entre el bajo número de espermatozoides, los fallos de implantación y los abortos recurrentes con un incremento en el porcentaje de espermatozoides aneuploides en el eyaculado. Por otra parte, el screening genético de aneuploidías (PGS) ha demostrado su eficacia en proporcionar información de la dotación cromosómica de los embriones, permitiéndonos transferir al útero embriones diploides.

OBJETIVOS:

El objetivo principal del presente estudio es evaluar si el uso del screening genético de aneuploidías (PGS) en pacientes de ovodonación con FISH de espermatozoides patológico incrementa el éxito de los tratamientos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

En el presente estudio se han incluido 36 parejas y 42 ciclos de ovodonación, en los que el varón presentó un estudio de FISH de espermatozoides patológico, hubo 5 parejas con ciclos en los 2 grupos del estudio. El FISH se realizó utilizando las sondas específicas de los cromosomas X, Y, 13, 15 y 21, evaluando 1.000 núcleos espermáticos por paciente. Retrospectivamente se analizaron los resultados de los 42 ciclos de ovodonación con o sin PGS llevados a cabo en nuestro centro desde enero de 2012 hasta diciembre de 2014. El PGS se realizó en blastómeros o en trofoctodermo. El ADN se amplificó mediante la técnica de Sureplex, y el producto se procesó con array CGH 24sureV3. Para el análisis estadístico se utilizó el test de Chi-cuadrado.

RESULTADOS:

En los 22 ciclos que se realizaron sin PGS, se hicieron 18 transferencias en fresco, con una media de 2 embriones

transferidos, dando lugar a 2 embarazos (11,11%), y 7 transferencias de embriones congelados sin ningún embarazo. Por otro lado se llevaron a cabo 20 ciclos con PGS, en los que se biopsiaron 117 embriones, siendo diploides 40 (34,182%). Se realizaron 14 transferencias en fresco, con una media de 1,62 embriones transferidos, consiguiéndose 8 gestaciones (57,14%) ($p < 0.05$), 4 transferencias de embriones congelados con 4 embarazos (100%), 2 pacientes abortaron. Por paciente se consiguió 2 embarazo de 17 (11,765%) en el grupo sin PGS y 12 embarazos de 19 (63,16%) en el grupo de PGS ($p < 0,01$).

CONCLUSIONES:

A la luz de estos resultados podemos concluir que en pacientes de ovodonación con un FISH espermático patológico el screening genético de aneuploidías por ARRAY-CGH ayuda a mejorar los resultados de forma muy significativa.

P-038 LA EXTRUSIÓN DEL SEGUNDO CORPÚSCULO POLAR NO AFECTA A LA MORFOCINÉTICA DEL PRIMER CICLO CELULAR DE LOS PRE-EMBRIONES TRIPRONUCLEARES PROCEDENTES DE ICSI

N. Grau Grau, MJ. Escribá Pérez, Y. Galiana Briones, T. Viloría Samochín, P. Gámiz Izquierdo, L. ESCRICH ALBELDA
IVI Valencia, Valencia
noelia.grau@ivi.es

INTRODUCCIÓN:

Tras la realización de la ICSI, es posible encontrar en baja frecuencia embriones que contiene tres pronúcleos en asociación no a la extrusión del segundo

corpúsculo polar. Si bien constituyen una población presumiblemente digónica, no existen estudios que analicen morfocinéticamente el primer ciclo celular.

OBJETIVOS:

Describir los parámetros morfocinéticos del primer ciclo celular (cc1) de los pre-embriones tripnucleares humanos derivados de ICSI (3PN), de acuerdo a

la extrusión o no extrusión del segundo corpúsculo polar (2CP) y, compararlo con los pre-embriónes correctamente fecundados (2PN).

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se comparó la cinética del cc1 de 24 TPN con 20 BPN.

Todos los embriónes proceden de pacientes que pertenecen a nuestro programa de donación de ovocitos.

Tras realizar el ICSI, los oocitos fueron cultivados en un incubador time-lapse. El análisis retrospectivo de las grabaciones nos permitió identificar los cigotos con: (i) 3PN y sin extrusión del 2CP (3PN-1CP); (ii) 3PN y con extrusión

del 2CP (3PN-2CP) y; (iii) 2PN y con extrusión del 2CP (2PN; control).

El escrutinio detallado de las primeras 36 horas de grabación nos permitió determinar los tiempos de ocurrencia de los principales eventos morfológicos del cc1 (variables directas): la extrusión del 2CP, aparición y desaparición de pronúcleos (PNA y PNF) y primera división embrionaria (DIV). Estas variables directas nos permitieron calcular las fases GAP (G1 y G2/M) y la fase S del cc1, como variables indirectas.

RESULTADOS:

Tras el estudio morfocinético del cc1 en los pre-embriónes 3PN derivados de ICSI, no se observaron diferencias

significativas en ninguna de las variables directas e indirectas estudiadas (Tabla), en función de la extrusión o no del 2CP. Por consiguiente, ambos especímenes pre-embriónes (3PN-1CP y 3PN-2CP) fueron agrupados y, la media de las variables estudiadas (3PN con/sin 2CP; Tabla) comparada con los pre-embriónes control (2PN). La duración total del cc1 fue significativamente más largo en los 3PN que en los 2PN (DIV; Tabla); posiblemente debido a una fase S más prolongada en los 3PN que en los 2PN (Tabla) mientras que las otras fases del cc1 fueron comparables entre ambos grupos (G1=4.3±1.6hrs; G2/M=2.4±1.3hrs).

CONCLUSIONES:

Los pre-embriónes 3PN humanos procedentes de ICSI, independientemente de la extrusión o no del 2CP mostraron una duración total del cc1 y, de las fases que lo integran comparables. Sin embargo, cuando se compara el cc1 de los 3PN con los 2PN, se observa que los 3PN requieren de mayor tiempo para replicar la dotación cromosómica extra, tal y como sugiere la duración de la fase S.

	3PN -1CP (n=9)	3PN -2CP (n=15)	Media 3PN con/sin 2CP (n=24)	2PN (n=20)
Tiempos de (hrs post-ICSI):				
Extrusión del 2CP		3.5±0.7 (3.1-3.9)		3.0±0.7 (2.6-3.4)
PNA	6.8±2.6 (4.8-8.8)	7.6±1.9 (6.6-8.7)	7.3±2.1 (6.4-8.2)	7.1±2.1 (6.1-8.1)
PNF	26.0±4.3 (22.7-29.3)	27.0±8.1 (22.5-31.4)	26.6±6.8 (23.7-29.5)	23.2±3.1 (21.7-24.7)
DIV	28.6±4.1 (25.4-31.7)	29.6±8.3 (25.4-34.3)	29.2±6.9 (26.3-32.2) ^b	25.4±2.8 (24.1-26.7) ^a
Fase G1		4.2±1.9 (3.1-5.2)		4.4±1.2 (3.7-5.1)
Fase S	19.4±4.8 (15.5-22.8)	19.3±7.8 (15.0-23.7)	19.3±6.7 (16.4-22.1) ^b	15.8±2.9 (14.4-17.2) ^a
Fase G2/M	2.6±0.6 (2.1-3.1)	2.7±0.6 (2.3-3.0)	2.6±0.6 (2.4-2.9)	2.0±1.8 (1.2-2.9)

Tabla. Morfocinética del primer ciclo celular de los pre-embriónes tripnucleares procedentes de icsi

P-039 EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN DEL RECEPTOR D2 DE DOPAMINA EN EL ESPERMATOZOIDE HUMANO

JL. Girela López (1), MM. Francou (1), N. Díaz Hernández (1), J. Ten Morro (2), R. Bernabeu (2), J. De Juan Herrero (1)
 (1) Universidad de Alicante, Alicante (2) Instituto Bernabeu, Alicante
girela@ua.es

INTRODUCCIÓN:

La dopamina es el neurotransmisor catecolaminérgico más importante del Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos y participa en la regulación de diversas funciones como la conducta motora, la emotividad, así como en la comunicación neuroendocrina. La presencia de receptores dopaminérgicos

fuera del SNC ha sugerido una interacción entre el sistema nervioso y otros sistemas funcionales, como es el caso del sistema reproductor. Son numerosos los estudios que muestran la presencia de diferentes receptores de sustancia neuroactivas en los espermatozoides humanos, sugiriéndose un papel regulador de su estado funcional. Sin embargo, hasta la fecha no se han

descrito la presencia y distribución de los receptores D2 de dopamina.

OBJETIVOS:

El objetivo del presente estudio es estudiar la presencia y distribución de receptores D2 en espermatozoides humanos, y sus posibles cambios tras la capacitación.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Las muestras seminales analizadas en el presente estudio proceden de 15 varones donantes voluntarios, que previamente habían firmado el correspondiente consentimiento informado. A las muestras se les realizó un seminograma básico. Todos los sujetos fueron clasificados como normozoospermicos siguiendo las recomendaciones de la OMS del 2010.

Para la capacitación de las muestras se utilizó la técnica de Swim-Up. Los espermatozoides, tanto en fresco como capacitados, fueron fijados dependiendo de si la técnica era microscopía óptica o electrónica. A las muestras se les

realizó un inmunomarcado indirecto con un anticuerpo anti-D2 producido en conejo, y un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo para microscopía confocal o con oro coloidal para microscopía electrónica de transmisión. Se estudió la presencia y distribución de los receptores D2 en espermatozoides frescos y capacitados.

RESULTADOS:

El inmunomarcado de estos receptores confirmó la presencia de receptores dopaminérgicos D2 en espermatozoides humanos. En las muestras en fresco los receptores D2 estaban localizados en el acrosoma y pieza intermedia de espermatozide. Tras la capacitación

la distribución se modificó, concentrándose el marcaje en forma de una banda ecuatorial a nivel de la cabeza, así como distribuyéndose por todo el flagelo. Dichos patrones fueron observados tanto en microscopía óptica confocal como con microscopía electrónica de transmisión.

CONCLUSIONES:

El receptor D2 de la dopamina se expresa en espermatozoides humanos y varía su posición según el estado funcional de los espermatozoides. Los cambios observados en la distribución de los receptores sugieren un papel regulador tanto de la motilidad como del proceso de reacción acrosómica.

P-040 CORRELACIÓN ENTRE UNA CLASIFICACIÓN EMBRIONARIA ÓPTIMA EN D+3 Y FORMACIÓN DE BLASTOCISTO.

P. Piqueras Trilles, M. Gallardo Molina, B. Migueles Pastor, L. Aguilera Duvisón, M. Hebles Duvisón, M. Dorado Silva, M. González Fernández, P. Sánchez Martínez
Clínica Ginemed, Sevilla
PPiqueras@ginemed.es

INTRODUCCIÓN:

Cuando estamos ante cohortes embrionarias grandes la estrategia considerada más oportuna para hacer una selección exhaustiva del mejor embrión es el cultivo a blastocisto. Diversos estudios correlacionan una buena clasificación del embrión en día tres de evolución con la llegada a blastocisto. Se busca el cultivo embrionario hasta día cinco porque tiene una mejor tasa de implantación respecto al embrión en día tres de evolución.

OBJETIVOS:

Valorar la correlación que existe entre la calidad de embriones en D+3 y la formación de blastocistos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio prospectivo de una cohorte de 52 pacientes de entre 18 y 40 años. Los criterios de inclusión que se

llevaron a cabo fueron los siguientes: Primer ciclo de estimulación ovárica en mujeres con reglas regulares (24-35 días), con ovarios accesibles, y >37 años con un periodo de esterilidad de un año, o mujeres >38 con un periodo de esterilidad de ≥ 6 meses. No debían presentar ninguna enfermedad incapacitante ni patologías previas como presencia de miomas de <3cm en el año anterior, no endometriomas >3cm. Ni hidrosalping en el año previo, y FSH de 15ui en los tres meses previos. Serologías negativas en los dos años previos. Y todos los ciclos con semen de donante.

Se estimula a pacientes con protocolo largo, posteriormente se realiza la punción ovárica para la recepción de los ovocitos. Tras microinyectar los ovocitos con semen de donante, cultivamos embriones hasta estadio de blastocisto para observar una posible correlación entre una óptima clasificación en día 3 (Asebir, 2009) y día 5 (Gardner y Schoolcraft 1999). Se

utilizaron la serie de medios G1plus y G2plus (Vitrolife Sweden AB, Goteborg, SWE) en incubador tri-gas Long Term Flat Bed Incubator G185 (K-SYSTEMS Kivex Biotech Ltd. Klintehøj Vænge. DK) a 37°C.

RESULTADOS:

298 blastocistos fueron incluidos en este estudio, de los cuales 125 fueron clasificados como grado de 3 o mejor grado de expansión y fueron analizados. 29 fueron clasificados como en estadio de hatching, 15 (51,7%) fueron de calidad A en día tres, 6 (20,7%) fueron embriones de calidad B, y 4 fueron embriones de calidad C y D (13,8% y 13,8%) respectivamente. 38 blastocistos fueron blastocistos expandidos (grado cuatro), 14 (36,8%) procedían de embriones de calidad A en día tres de evolución, 12 (31,6%) de embriones tipo B y 9 y 3 de embriones C y D (23,7% y 7,9%) respectivamente. De los 58 blastocistos expandidos (grado 3), 10 (17,2%) procedían de

embriones tipo A en día 3, 21 (36.2%) de embriones de calidad tipo B, 17 y 10 de embriones de calidad C y D (29.3% y 17.2%) respectivamente. P-value < 0.001, indica una fuerte correlación entre las variables cualitativas.

CONCLUSIONES:

La evaluación de embriones en día tres y día cinco de desarrollo es subjetiva, por lo tanto cada laboratorio debe realizar su propio análisis para determinar la correlación. Se deben realizar otros estudios con una N mayor para valorar y evaluar los resultados reproductivos de los embriones y confirmar la hipótesis.

Un análisis estático de la calidad de los embriones en el día tres es una herramienta útil para predecir la tasa de formación de blastocistos de la cohorte de embriones de un paciente. Esta estrategia presenta la desventaja de exponer a los embriones a subóptimas condiciones para la evaluación, pero es menos tiempo y una alternativa económica a la evaluación morfocinética.

BIBLIOGRAFÍA:

Vanessa N.Weitzman, M.D., Jennifer Schnee-Riesz, M.D., Claudio Benadiva, M.D., John Nulsen, M.D., Linda Siano, M.S., and Donald Maier, M.D. Predictive value of embryo grading for embryos with known outcome. *Fertil Steril* 2010: 659-652.

Catherine Racowsky, Ph.D., Katharine V. Jackson, B.S., Natalie A. Cekleniak, M.D.,

Janis H. Fox, M.D., Mark D. Hornstein, M.D., and Elizabeth S. Ginsburg, M.D. The number of eight-cell embryos is a key determinant for selecting day 3 or day 5 transfer. *Fertil Steril* 2000:558-564.

P-041 INFLUENCIA DE LA RELACIÓN FSH / LH EN LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA DENTRO DE LOS RESULTADOS DE FIV EN MUJERES MAYORES DE 35 AÑOS: UN ESTUDIO RANDOMIZADO

F. Aspichueta Vivanco (1), R. Matorras Weinig (1), L. Crisol Ortiz (2), A. Expósito Navarro (3), B. Prieto Molano (1), R. Mendoza Hourtourt (3)

(1) IVI - Bilbao, Bilbao. (2) Hospital de Donosti, San Sebastián. (3) Hospital de Cruces, Barakaldo
faspichu@hotmail.com

INTRODUCCIÓN:

El papel de la LH en la estimulación ovárica es controvertido. Estudios valoran la eficiencia de la LH en grupos de buen pronóstico, pero su papel en mujeres mayores no está claro del todo.

OBJETIVOS:

El propósito de este estudio fue evaluar la influencia de dos protocolos diferentes empleando diferentes relaciones de FSH/LH (1.2 vs 4.1) en los resultados de FIV/ICSI, en mujeres mayores de 35 años.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se llevó a cabo un estudio prospectivo, aleatorizado incluyendo 413 mujeres

mayores de 35 años. Se crearon dos grupos: Grupo 2/1 ratio (recibió una dosis diaria de 300 UI de FSH rec y 150 UI de LH rec) y el grupo de 4/1 de ratio (300 UI de rec FSH y LH 75 de rec). La dosis se mantuvo durante al menos 6 días y se ajustó después, si era necesario.

RESULTADOS:

Los resultados entre ambos grupos fueron similares en cuanto a: la edad, la altura, el peso, los niveles de FSH basal, la duración de la infertilidad, así como otros parámetros demográficos. Los niveles de estradiol fueron similares en el grupo de 2/1 y 4/1 en el (2.300 ± 1,179 vs 2.110 ± 1,161), así como el número de ovocitos obtenidos (9,04 ± 5,54 vs 8,55 ± 5,07), inseminados (7,18

± 4,89 vs 6,67 ± 4,72), y fertilizados (3,92 ± 3,21 vs 3,55 ± 2,73). La tasa de embarazo también fue similar en ambos grupos de 33,9 % en el grupo de 2/1 relación y de 35,5 % en el grupo de 4/1.

CONCLUSIONES:

Los diferentes marcadores de resultado de FIV, así como las tasas de embarazo fueron los mismos empleando una relación 4/1 FSH/LH y 2/1 relación LH/FSH. Probablemente refleja que el umbral de la LH se alcanzó con 75 IU y la duplicación de la dosis no tiene beneficios los resultados FIV.

P-042 RELACIÓN ENTRE LA FRAGMENTACIÓN DINÁMICA DEL ADN ESPERMÁTICO Y LA SUPERVIVENCIA A LA CONGELACIÓN EN MUESTRAS DE DONANTES DE SEMEN

J. Bataller Sánchez, A. Barberá Alberola, M. Tormos Berenguer, M. Ruiz Jorro
CREA, Valencia
antonio.barbera@creavalencia.com

INTRODUCCIÓN:

La criopreservación seminal es un proceso común en las unidades de reproducción asistida. Entre los parámetros que se valoran para establecer si una muestra de semen ha sobrevivido correctamente a la congelación o como indicador de la calidad del procedimiento, están la movilidad y progresión de los espermatozoides post-descongelación, así como su proporción respecto a la movilidad inicial. Sin embargo, la valoración de la integridad del ADN espermático después de la congelación y la longevidad, medida como el incremento en el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado a lo largo del tiempo, no suelen ser tenidas en cuenta y podría ser un dato a tener en cuenta puesto que la fragmentación del ADN espermático (FrADN) se ha relacionado con peor capacidad reproductiva en los espermatozoides.

OBJETIVOS:

El objetivo del siguiente estudio es evaluar si existe una relación entre la supervivencia a la congelación y la FrADN en muestras normozoospermicas de donantes de semen.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se han analizado las muestras de 25 donantes. A cada donante se le realizó la determinación de FrADN y longevidad y se le congelaron entre 15 y 20 muestras en las que se determinó la supervivencia post-descongelación. Todas las muestras fueron analizadas siguiendo los criterios OMS-V 2010. La evaluación de la FrADN basal y dinámica se realizó mediante la técnica TUNEL. Cada muestra

se dividió en 3 alícuotas: t0: para FrADN inicial (fijada con formaldehído 2% tras lavado). t2: para FrADN pasadas 2 horas tras la fijación de t0. t24: para FrADN pasadas 24 horas tras la fijación de la alícuota a tiempo inicial. Se analizaron 500 espermatozoides de cada alícuota mediante epifluorescencia y se calculó el porcentaje de espermatozoides con FrADN.

La congelación se llevó a cabo en vapores de nitrógeno líquido, utilizándose Test Yolk Buffer (Irvine Scientific) en proporción 1:1 y pajuelas termosellables de alta seguridad (CBS). Se obtuvo 1 pajueta extra en cada congelación para evaluar la movilidad post-descongelación. La tasa de supervivencia (TS) se calculó mediante la fórmula: $TS = (\% \text{ spz móviles post-descongelación} / \% \text{ spz móviles pre-congelación}) \times 100$.

RESULTADOS:

Se han considerado alterados resultados con más de un 20% de espermatozoides con FrADN. Para la longevidad se considera alterado un valor superior a 2,5% de incremento cada hora durante las 2 primeras horas o de 0,5% por hora durante las 24 horas.

La TS en los casos con FrADN-T0 alterada ha sido de $49,98 \pm 4,68$ mientras que la TS en las muestras con FrADN-T0 normal ha sido de $59,94 \pm 10,30$. La diferencia en los porcentajes de supervivencia ha sido aun más evidente cuando se ha considerado también la longevidad, observándose en casos de FrADN-T0 normal y longevidad normal una TS de $61,40 \pm 9,56$, mientras que en los casos de FrADN-T0 alterada y longevidad alterada, la TS fue de $48,85 \pm 6$.

Al realizar una regresión lineal para comprobar si laFrADN basal en T0 y/o la longevidad tienen influencia sobre la tasa de supervivencia, no se ha encontrado diferencia estadísticamente significativa (FrADN-T0 0,118; P valor > 0,05, longevidad 0,462; P valor > 0,05). Tampoco hemos observado significancia al valorar los casos con supervivencia óptima, considerados como aquellos con más de un 50% de supervivencia (FrADN-T0 0,178; P valor > 0,05, longevidad 0,414; P valor > 0,05).

CONCLUSIONES:

A pesar de que los resultados parecen indicar una tendencia a que aquellos donantes con mejor integridad del ADN y longevidad post-descongelación tienen una mayor tasa de supervivencia a la congelación, el análisis estadístico no demuestra diferencias significativas, posiblemente debido al tamaño de la muestra.

Es necesario realizar más estudios con un mayor número de muestras para analizar qué parámetros pueden identificar a los donantes más óptimos, así como la relación entre la integridad y longevidad del ADN espermático y la calidad de los donantes.

BIBLIOGRAFÍA:

Sherman JK. Synopsis of the use of frozen human semen since 1964: state of the art of human semen banking. *Fertility and Sterility*. 1973; 24 (5):397-412. Krausz C, Forti G. Sperm Cryopreservation in male infertility due to genetic disorders. *Cell Tissue Bank*. 2006; 7(2):105-12. Said TM, Gaglani A, Agarwal A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive Biomedicine Online*. 2010; 21(4):456-462. Isachenko E, Isachenko V, Sanchez R,

et al. Cryopreservation of spermatozoa: Old routine and new perspectives.

En: Donnez J, Kim S, eds. Principles and Practice of Fertility Preservation. Cambridge: Cambridge University Press, 2010. Isachenko E, P. Mallmann, G. Rahimi, J. Risopatròn, M. Schulz, V. Isachenko and R. Sánchez. Vitrification Technique - New Possibilities for Male Gamete Low-Temperature Storage. Current Frontiers in Cryobiology. Prof. Igor Katkov (Ed.); 2012. Sergerie M, Laforest G, Boulanger K, Bissonnette F, Bleau G. Longitudinal study

of sperm DNA fragmentation as measured by terminal uridine nick end-labeling assay.

Human Reproduction 2005;20:1921-7.

Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. Human Reproduction 2005; 20:3446-51. Thomson LK, Fleming SD, Schulke L, Barone K, Zieschang JA, Clark AM. The DNA integrity of cryopreserved spermatozoa separated for use in assisted reproductive technology is unaffected by the type of cryoprotectant

used but is related to the DNA integrity of the fresh separated preparation. Fertility and Sterility.2009;92(3):991-1001.

Fuller B, Paynter S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. Reprod Biomed Online. 2004;9(6):680-91.

Mortimer D. Current and future concepts and practices in human sperm cryobanking. Reprod Biomed Online. 2004;9(2):134-51.

P-043 EVALUACIÓN DE LA UTILIDAD CLÍNICA DE UN SISTEMA DE MORFOCINÉTICA EN UN PROGRAMA DE ESET

A. Clavero Gilabert, MC. Gonzalvo López, B. Romero Guadix, ML. López Regalado, V. Díaz Prado, M. Luengo Díaz, P. Navas Bastida, I. Sánchez Castelló, A. Guzmán Olmedo, L. Martínez Navarro
U. Reproducción. Complejo Hospitalario Granada. IBS Granada.
anaclavergilabert@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

La necesidad de una buena selección embrionaria ha llevado a la introducción de la morfocinética en el laboratorio de embriología.

Estos sistemas se basan en la monitorización mediante fotogramas de los embriones generados in vitro, lo cual nos da un análisis preciso y específico del desarrollo embrionario, todo ello sin exponer a los embriones a agresiones externas. Pueden usarse como una herramienta más en la implantación de la transferencia de embrión único (eSET).

OBJETIVOS:

Estudiar si mejora la selección embrionaria mediante morfocinética en un programa de eSET.

MATERIAL Y MÉTODOS:

El estudio se ha realizado de manera prospectiva utilizando un estudio de casos-controles, desde octubre de 2013 a marzo de 2015. En el grupo de estudio se incluyeron 80 parejas de buen pronóstico (mujeres <38 años,

primer ciclo FIV/ICSI, IMC 18,5-29 kg/m², sin abortos de repetición) y los embriones resultantes se cultivaron en un sistema PrimoVision eligiéndose el de mejor calidad para eSET, mientras que aquellos no transferidos fueron vitrificados individualmente. El grupo control constó de 44 parejas seleccionadas de buen pronóstico (mismos criterios) en las que se realizó eSET más vitrificación de embriones individualmente. Se analizaron las tasas de gestación clínica (observación de saco embrionario con latido cardíaco) en ambos grupos, así como el tamaño muestral. Para evaluar la homogeneidad de los grupos se analizaron las variables correspondientes a las características clínicas de las parejas (edad de la mujer, tiempo de esterilidad, indicación clínica), a la respuesta a la estimulación (días de estimulación, dosis total de FSH, estradiol el día de hCG) y a resultados de laboratorio (número de ovocitos obtenidos, tasa de fecundación, número de embriones de calidad A/B, número de embriones criopreservados). Se utiliza el test x² para variables cualitativas y el test de la t de Student para variables cuantitativas. Para determinar el tamaño del efecto se determinó la odds ratio.

RESULTADOS:

No se observan diferencias significativas ni en las variables epidemiológicas ni en la respuesta a la estimulación entre los grupos.

Tampoco se observan diferencias significativas en la media de ovocitos obtenidos entre el grupo de estudio y control (10,5 ± 3,5 vs 9,2 ± 3,9 respectivamente), en el número de MII (8,9 ± 3,6 vs 9,0 ± 3,9), en la tasa de fecundación (66,3 ± 9,8 vs 72,7 ± 9,9), en la media de embriones disponibles de buena calidad (3,8 ± 1,9 vs 3,8 ± 1,5) ni de embriones criopreservados (3,0 ± 1,3 vs 2,9 ± 1,0).

La tasa de gestación clínica en el grupo de estudio fue del 33,8% mientras que en el grupo control fue del 39,0%, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, OR 0,80 (0,36;1,17). En la tasa de gestación acumulada no se encontraron diferencias entre el grupo de estudio (50,0%) y el grupo control (46,3%), con una OR de 1,16 (0,54;2,46). La tasa de gestación por criotransferencia fue mayor en el grupo de estudio (22,4% vs 10%), y aunque se observó una

tendencia a la significación (OR 2,60) no se encontraron diferencias (IC 0,68-9,96).

La tasa de aborto fue similar en ambos grupos (10,0% vs 10,5%; OR=1,06; IC 0,18-6,36).

CONCLUSIONES:

Nuestros resultados no son capaces de demostrar una utilidad clara en el uso de la morfocinética en transferencias electivas de embrión único. Sin embargo, existe una tendencia a mejorar la tasa de gestación por criotransferencia con la selección

mediante el sistema PrimoVision.

Serían necesarios encaminar los estudios en evaluación morfocinética a la selección de embriones para criopreservación, donde puede que exista un efecto positivo en las tasas de gestación.

P-044 COMPARACIÓN DE LAS TASAS DE EMBARAZO OBTENIDAS SEGÚN EL NÚMERO DE CICLO DE FECUNDACIÓN IN VITRO

E. Palacios Méndez, JR. Ortiz de Galisteo Cifuentes, J. Lara Laranjeira, JA. Domínguez Arroyo, S. Álvarez Miguel
Instituto Extremeño de Reproducción Asistida, Badajoz
evarpalacios@hotmail.com

INTRODUCCIÓN:

Aunque la tasa de éxito de los ciclos de Fecundación in vitro (FIV) es uno de los datos más relevantes y estudiados en los centros de Reproducción Asistida (RA), no existe mucha información sobre ese mismo parámetro para los segundos y sucesivos ciclos de FIV. La tendencia general es a considerar que según se avanza en el número de ciclos, la tasa de embarazo puede disminuir, aunque no hay razones científicas de peso que soporte esta opinión y esta variable no suele ser considerada en las revisiones realizadas al respecto (Jain et al., 2005, Nardelli et al., 2014).

OBJETIVOS:

Comprobar si se producen diferencias en la tasa de embarazo evolutivo según el ciclo de FIV que realiza la paciente.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se ha realizado un estudio retrospectivo sobre todos los ciclos de FIV desde noviembre de 2012 hasta febrero de 2015 en nuestro centro. Las estimulaciones fueron realizadas en todos los casos mediante un ciclo de antagonistas y la punción folicular se realizó 36h después de la administración de HCG. Los ovocitos obtenidos fueron microinyectados mediante técnica de ICSI y, después de comprobar la fecundación, se cultivaron

hasta día 3 o 5 para su transferencia intrauterina siguiendo el método de trabajo de nuestro centro. Se realizaron un test en orina 15 días después de la punción y controles posteriores hasta comprobar el latido fetal positivo (LFP) que consideramos como desarrollo evolutivo. Las medias obtenidas para cada población fueron cotejadas con la T de Student según el programa SPSS v15.0.

RESULTADOS:

Los resultados obtenidos muestran que la tasa de embarazo con desarrollo evolutivo en el primer ciclo de FIV (n=270) fue de 35,2%, con una edad media de 35,7 años. En el segundo ciclo (n=113) la tasa que obtuvimos fue casi idéntica, con un valor de 35,4%, y con una edad media de 35,9 años.

Estos resultados no muestran diferencias significativas. Los terceros (n=59) y cuartos (n=18) ciclos, fueron agrupados en una única categoría (n=77) con una tasa de embarazo de 30,0%, siendo en este caso la edad media de 37,0 años. Aunque existe una disminución con respecto al primer y segundo ciclo, las diferencias tampoco fueron significativas. Los datos referentes a la media de ovocitos MII obtenidos (5,8; 6,1; 6,4) y embriones transferidos (1,79; 1,80; 1,75) fue muy similar en los tres casos. La tasa de aborto en los primeros y segundos

ciclos fue muy similar (17,9% y 17,5% respectivamente) y sufría un incremento notable para los ciclos terceros o cuartos (26,1%), que aunque no muestra diferencias estadísticamente significativas, sí que parece presentar una tendencia a aumentar en estos ciclos.

CONCLUSIONES:

La realización de ciclos adicionales en las clínicas de RA es una situación que los centros han de abordar constantemente y una orientación adecuada de los pacientes en cuanto a los porcentajes de éxito en estos casos sería muy conveniente. Nuestros resultados muestran que independientemente del ciclo de FIV que la paciente realice no se producen modificaciones sustanciales en el número de ovocitos obtenidos y embriones a transferir, y las tasas de embarazo evolutivo son muy similares. En nuestro centro, la edad media de las parejas que acceden a estos ciclos adicionales no es mayor que las que acceden a los primeros ciclos, pudiendo ser una explicación a nuestros resultados similares en cuanto a tasa de embarazo (Gleicher et al., 2014). Si parece existir una tendencia a un mayor número de abortos cuando las pacientes realizan un tercer o cuarto ciclo, posiblemente indicando problemas de implantación en este grupo, aunque este aspecto habría que confirmarlo en posteriores estudios.

BIBLIOGRAFÍA:

Gleicher N., Kushnir V.A., Weghofer A. and Barad D.H. (2014) The "graying" of

infertility services: an impending revolution nobody is ready for. *Reprod Biol Endocrinol.* (2014); 12: 63.

Jain A., Robins J.C, Williams D.B. and Thomas M.A. (2005) The effect of multiple cycles in oocyte donors. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2005); 192: 1382-4.

Nardelli A.A., Stafinski T, Motan T., Klein K. and Menon D. (2014) Assisted reproductive technologies (ARTs): Evaluation of evidence to support public policy development. *Reprod Health.* (2014); 11: 76.

Ciclo	FIV		
	1º	2º	≥3º
Nº Ciclos	270	113	77
Edad media	35.7	35.9	37.0
Nº embriones TE	1.79	1.8	1.75
Media MII	5.8	6.1	6.4
Tasa embarazo/ transferencia (%)	35.2	35.4	29.9
Tasa de aborto (%)	17.9	17.5	26.1

Tabla 1. Datos resumen de diferentes parámetros analizados según el número de ciclos

P-045 CULTIVO EMBRIONARIO AGRUPADO A BAJA TENSIÓN DE OXÍGENO FRENTE CULTIVO EMBRIONARIO INDIVIDUAL ESTÁNDAR: UN ESTUDIO PROSPECTIVO RANDOMIZADO

N. Prados Dodd (1), M. Ruiz Pérez (1), V. Blasco Rodríguez (1), E. Santamaría López (1), R. Quiroga Gil (2), M. Fernández Sánchez (2)
(1) IVI Sevilla, Sevilla. (2) IVI Málaga, Málaga
nicolas.prados@ivi.es

INTRODUCCIÓN:

Estudios previos en humanos y otros animales sugieren que cultivar los embriones en grupos empleando volúmenes de medio de cultivo reducidos mejora el desarrollo embrionario. Por otro lado, altas concentraciones de oxígeno podrían ser perjudiciales para el desarrollo embrionario debido al estrés oxidativo que causan las especies reactivas del oxígeno. No hay todavía un protocolo estándar para el cultivo in vitro de embriones humanos.

OBJETIVOS:

El objetivo de este estudio es demostrar que existen mejores tasas de implantación cuando los embriones humanos son cultivados en grupo y a bajo oxígeno, en vez de individualmente y en condiciones de oxígeno atmosféricas.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio prospectivo randomizado. 167

pacientes FIV/ICSI de IVI Sevilla fueron randomizadas en proporción 1:1 desde abril de 2013. En el grupo de estudio, han participado 87 pacientes, cuyos embriones fueron cultivados en grupo y a baja concentración de oxígeno (MINC[□], COOK), con un máximo de 5 embriones por gota de cultivo. En el grupo control, en el que han participado 80 pacientes hasta el momento, los embriones fueron cultivados individualmente y a concentraciones de oxígeno atmosféricas (Hera cell@ 150, Heraeus). Para obtener un poder estadístico del 80% y un $p < 0.5$, el tamaño muestral calculado es de 182 pacientes, 91 en cada rama.

RESULTADOS:

La tasa de blastocistos fue significativamente más alta en el grupo de estudio (55.9% vs 45.5%; $p < 0.01$). También, el porcentaje de embriones viables fue significativamente más alto en el grupo de estudio (55% vs 46%; $p < 0.001$). Había

diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en la tasa de implantación (68% vs 46%; $p < 0.01$) y la tasa de embarazo gemelar fue aproximadamente el doble en el grupo de estudio (58% vs 25%; $p < 0.001$), mientras que la tasa de embarazo fue comparable en ambos grupos. La tasa de embarazo clínico no fue estadísticamente significativa (74% vs 65%), ni la tasa de aborto aunque fue más baja en el grupo de estudio (10% vs 20%).

CONCLUSIONES:

Nuestros resultados sugieren que la tasa de implantación es más alta al cultivar los embriones en grupo y a baja concentración de oxígeno que al cultivar los embriones individualmente y concentraciones atmosféricas de oxígeno. De modo que, el éxito de un ciclo de FIV se puede incrementar al mejorar las condiciones de cultivo embrionario más que mejorando la selección embrionaria.

P-046 EVALUACIÓN DE LA VALIDEZ DIAGNÓSTICA DE ANTICUERPOS ANTI CITOMEGALOVIRUS IGM E IGG EN LA INFECCIÓN ACTIVA DE CITOMEGALOVIRUS EN DONANTES DE SEMEN

M. Gañán Parra (1), A. Vaquero Argüelles (1), A. Yoldi Chaure (1), R. Peña Cotarelo (2), A. Vargas Fernández (1), D. Rodríguez Piñeiro (1), L. Corpas Antequera (1), A. Ladrón de Guevara Rodríguez (1), J.P. Ramírez López (1), J.A. Castilla Alcalá (1)
(1) CEIFER, Granada, (2) MásVida Reproducción, Sevilla
CALIDAD@CEIFER.COM

INTRODUCCIÓN:

La infección primaria por Citomegalovirus (CMV) durante el embarazo puede afectar seriamente al feto, de manera que en técnicas de reproducción humana asistida (TRHA) debería evitarse que mujeres que no han estado antes en contacto con el CMV lo hagan al exponerse a semen de donante. Para ello, los donantes de semen con infección activa de CMV no deberían aceptarse ya que se ha detectado CMV en el semen de estos. Hasta ahora, el diagnóstico de infección activa en donantes de semen se basa en las determinaciones de los niveles de anticuerpos anti CMV IgM (Ac anti CMV IgM) y/o IgG (Ac anti CMV IgG). Sin embargo, según la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, ambas determinaciones son insuficientes ya que los Ac anti CMV IgM pueden persistir varios meses después de la infección o aumentar por infecciones víricas (herpesvirus humano 6 y virus de Epstein-Barr) y el nivel de Ac anti CMV IgG no es útil para detectar infecciones activas.

OBJETIVOS:

Evaluar la validez diagnóstica de anticuerpos anti CMV IgM e IgG en la infección activa de Citomegalovirus en donantes de semen.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Durante el año 2014 se realizaron extracciones de sangre a donantes de semen para determinar el valor de los Ac anti CMV IgM y congelar una muestra de suero (seroteca). Si el resultado era positivo (Índice>0,9) se descongeló la muestra de la seroteca para: determinar el valor de Ac anti CMV IgG (Positivo si el Índice>1) y realizar la PCR Real Time para CMV. Así mismo, si existía muestra de semen congelado fechada el mismo día de la extracción de sangre, se procedió a descongelar esta muestra de semen y realizar la PCR Real Time para CMV.

RESULTADOS:

Ningún donante presentó síntomas clínicos de infección por CMV en el momento de la extracción sanguínea. Se determinó el valor de Ac anti CMV IgM en 374 muestras serológicas de donantes de semen, de las cuales 13 (3,5%) resultaron positivas (1: 1,38; 2: 1,15; 3: 1,91; 4: 0,98; 5: 1,99; 6: 1,17; 7: 0,95; 8: 2,30; 9: 2,39; 10: 1,05; 11: 1,28; 12: 1,39; 13: 0,90). No se disponía de suero congelado para proceder a los análisis posteriores en 3 casos (2, 11, 13). Se determinó, por tanto, en las existentes 10 muestras serológicas descongeladas el valor de Ac anti CMV IgG y la PCR Real Time. El valor de Ac anti CMV IgG resultó positivas en el 100% de estas muestras (1: 27,44; 3: 18,03;

4: 4,60; 5: 18,79; 6: 21,50; 7: 4,32; 8: 10,84; 9: 1,16; 10: 31,87; 12: >40). El resultado de la PCR Real Time para CMV fue negativo en el 100% de estas muestras (1: Negativo; 3: Negativo; 4: Negativo; 5: Negativo; 6: Negativo; 7: Negativo; 8: Negativo; 9: Negativo; 10: Negativo; 12: Negativo). Se disponía de 3 muestras de semen congeladas en la misma fecha de la extracción de sangre (4, 9, 10). El resultado PCR Real Time para CMV en estas muestras de semen descongeladas fue negativo (4: Negativo; 9: Negativo; 10: Negativo).

CONCLUSIONES:

Las determinaciones de anticuerpos anti CMV IgM e IgG no son útiles para el diagnóstico de la infección activa por CMV en donantes de semen ya que un resultado positivo de estas no se corresponde con la presencia de virus circulante en sangre periférica ni en semen.

Nuestros datos confirman lo recomendado por diversas sociedades científicas sobre no utilizar los anticuerpos anti CMV IgM en población asintomática como screening de infección activa por CMV. Solo tiene interés utilizar estos anticuerpos ante síntomas de infección por CMV (fatiga, dolores musculares, dolor de cabeza, fiebre).

P-047 LA SUPLEMENTACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO EMBRIONARIO GENERA DIFERENCIAS IMPORTANTES EN EL DESARROLLO

C. Olmedo Illueca (1), D. Monleón Salvadó (2), JM. Morales Tatay (3), A. García Belda (1), N. Díaz Hernández (1), I. Cuevas Sáiz (1)
(1) Hospital General Universitario de Valencia, (2) Fundación del Hospital Clínico de Valencia- INCLIVA, (3) Unidad Central de Investigación en Medicina (INCLIVA)
icuevassaiz@yahoo.es

INTRODUCCIÓN:

La selección embrionaria actual se basa casi exclusivamente en criterios morfológicos, lo que hace que sea altamente subjetiva y limitada. Este hecho ha llevado a muchos investigadores a explorar tecnologías adicionales para la valoración del potencial reproductivo del embrión de forma objetiva. Una de ellas es la metabolómica del medio de cultivo embrionario, donde se analiza el medio donde el embrión ha se ha desarrollado en el cultivo in vitro. Hace dos años, nuestro grupo presentó un modelo capaz de discriminar entre embriones que implantaban y que no en base a diferencias significativas en las concentraciones de cuatro metabolitos (butirato, glutamato, alanina y arginina) en cultivos de embriones humanos.

OBJETIVOS:

El objetivo del estudio es analizar el efecto que tiene la adición de diferentes metabolitos al medio de cultivo sobre la evolución y el perfil metabólico del embrión. Los metabolitos con los que

se suplementan los medios son los discriminantes entre embriones que implantan y que no.

MATERIAL Y MÉTODOS:

La técnica seleccionada para llevar a cabo el análisis de los medios fue la resonancia magnética nuclear (RMN). Se emplearon embriones de ratón para la validación de los resultados del estudio en embriones humanos. Se adquirieron 55 embriones de ratón en estadio de pronúcleos que fueron desvitrificados y cultivados en microgotas cubiertas de aceite mineral de 40 µl de medio de cultivo. El grupo control fue cultivado en medio G1.5 plus de Vitrolife®. Se crearon 6 grupos de estudio donde se suplementaba el mismo medio con los tres metabolitos más significativos del modelo predictivo (butirato, glutamato y arginina) añadidos a dos concentraciones diferentes. Se observó el desarrollo individual de cada embrión. En día 2 de cultivo, los embriones fueron cambiados a microgotas de medio fresco y el medio donde se habían desarrollado durante 24 horas fue recopilado para su posterior análisis por RMN.

RESULTADOS:

Tras el cultivo de los embriones en medios suplementados con dichos metabolitos encontramos una mejoría clara en uno de los grupos a nivel morfológico con respecto al control y en otro de los grupos observamos un bloqueo de todos los embriones. El perfil metabólico obtenido por el análisis del medio por RMN también presentaba diferencias significativas.

CONCLUSIONES:

Como ya demostramos anteriormente, los embriones que implantan muestran un perfil metabólico distinto al de los embriones que no implantan.

Aunque somos conscientes de que el trabajo con embriones de ratón no se puede extrapolar a lo que ocurriría en humanos, podemos concluir que la suplementación del medio de cultivo puede modificar tanto la viabilidad del embrión como su patrón metabólico. Estos estudios nos plantean la posibilidad de suplementar los medios con el fin de mejorar el desarrollo embrionario in vitro.

P-048 ANÁLISIS DEL MOSAICISMO CROMOSÓMICO EN TROFOECTODERMO DE EMBRIONES ANEUPLOIDES MEDIANTE ARRAY-CGH.

A. Gomez Duro (1), E. Sánchez Gonzalez (1), E. Gil Vilariño (1), A. Polo Picasso (1), E. Gómez-Sánchez (2), A. Obradors (3), E. Fernández García (1)

(1) Geniality Diagnóstico Genético, Madrid, (2) Tahe Fertilidad, Murcia, (3) EUGIN, Barcelona
agomez@geniality.es

INTRODUCCIÓN:

Las tasas de embriones aneuploides se reducen en estadio de blastocisto en comparación con las etapas de división, sin embargo, muchos estudios han confirmado que las anomalías cromosómicas y el mosaicismo siguen siendo comunes y que incluso embriones con severas anormalidades cromosómicas son a menudo capaces de desarrollar hasta estadio de blastocisto.

Está descrito que el mosaicismo se presenta en más de la mitad de los embriones aneuploides, con un porcentaje de mosaicismo variado. El riesgo de un error de diagnóstico debido al mosaicismo cromosómico se reduce por el análisis de varias células obtenidas en la biopsia del Trofoectodermo (TE) donde se ha demostrado que más de la mitad de los embriones mosaicos no contienen células normales, mientras que solo un porcentaje de los embriones son mosaicos diploide-aneuploide.

OBJETIVOS:

El objetivo principal del presente estudio es analizar la presencia de mosaicismo en los embriones en estadio de blastocisto, mediante la técnica de screening genético de aneuploidías, array-CGH, con el fin de determinar la contribución del mismo en el diagnóstico preimplantacional.

MATERIAL Y MÉTODOS:

En el presente estudio se han incluido 40 blastocistos biopsiados en día+5, o de día+6, en 9 ciclos de 9 parejas,

edad media de las pacientes de 39 años (33-46); 8 con cariotipo en la pareja normal, y una con un mosaico 46,XX;45,X0, el resto de indicaciones fueron; FISH-e alterado (3) en uno de los casos con ovodonación, EMA (2), AR (1), embarazo previo mosaico (1), y en un caso no había indicación clínica patológica. El PGS se realizó en trofoectodermo (TE) biopsiado en día +5 y +6, mediante láser, previo a la vitrificación de los embriones. El ADN se amplificó mediante la técnica de Picoplex (Rubicon) y el producto se procesó con arrayCGH 24sureV3. Las imágenes fueron analizadas con el software BlueFuse 4.2 (BlueGnome, Cambridge UK).

RESULTADOS:

De los 40 blastocistos analizados, 19 (47,5%) de ellos fueron diploides.

Los 21(52,5%) restantes fueron aneuploides, de los cuales 11 (52%) presentaron mosaicismo. El 27% (3) de los mosaicos presentaban una línea combinada diploide-aneuploide mientras que el 73% (8) restante presentaban todas las líneas celulares alteradas.

CONCLUSIONES:

La biopsia del TE junto con la técnica de array-CGH, se plantea como el enfoque óptimo para el screening genético preimplantación, permitiendo detectar la presencia del mosaicismo cromosómico, siempre que el porcentaje de células pertenecientes a la línea mosaica represente más del 25% del total de las células analizadas,

reduciendo así el riesgo de error de diagnóstico.

Algunos embriones mosaico anormales, sin embargo, podrían no ser identificados debido a que la biopsia de TE pueda no ser representativa del embrión, dando solo un resultado de células euploide. Es importante establecer tanto el porcentaje de embriones euploide-aneuploide, como los umbrales de detección de mosaicismo con el fin de reducir al máximo las posibilidades de transferencia de embriones anormales.

BIBLIOGRAFÍA:

E. Fragouli, S. Alfarawati, D. D. Daphnis et al., -Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: scientific data and technical evaluation,- Human Reproduction, vol. 26, no. 2, pp. 480-490, 2011.

E. Fragouli, S. Alfarawati, K. Spath et al., -The origin and impact of embryonic aneuploidy,- Human Genetics, vol. 132, no. 9, pp. 1001-1013, 2013.

A. Capalbo, G. Wright, T. Elliott, F.M. Ubaldi, L. Rienzi, and Z. Peter Nagy., FISH reanalysis of inner cell mass and trophectoderm samples of previously array-CGH screened blastocysts shows high accuracy of diagnosis and no major diagnostic impact of mosaicism at the blastocyst stage .Human Reproduction, Vol.28, No.8 pp. 2298 -2307, 2013.

P-049 ¿ELIMINAN LOS PROCEDIMIENTOS DE SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES MÓVILES EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN SEMEN DE DONANTE?

A. Vaquero Argüelles (1), A. Yoldi Chaure (1), M. Gañán Parra (1), J. Alonso Conde (1), P. Carrasco Salas (2), J. López Siles (2), JA. Ángel Pérez (2), R. Díaz Giráldez (3), JP. Ramírez López (1), JA. Castilla Alcalá (1), S. Zamora López (1)
(1) CEIFER, Granada, (2) Genetaq, Centro de Genética Molecular, Sevilla, (3) MásVida Reproducción, Sevilla
calidad@ceifer.com

INTRODUCCIÓN:

La presencia del virus del papiloma humano (VPH) en semen de donante así como su efecto negativo en los resultados de las técnicas de reproducción humana asistida ha sido confirmado por diversos autores, describiéndose una disminución de las tasas de fecundación y gestación así como aumento de las tasas de aborto. No está claro el efecto de las técnicas de selección espermática en la eliminación del virus y no existen muchos estudios al respecto.

OBJETIVOS:

Determinar si los métodos de recuperación de espermatozoides móviles como swim up directo y gradientes de densidad eliminan el VPH del semen infectado.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se utilizaron 4 eyaculados de semen de un mismo donante criopreservados

en pajuelas CBS de alta seguridad biológica tras adición directa del medio crioprotector en el eyaculado y posterior congelación mediante sistema computerizado para la programación de la curva de bajada de la temperatura. Las muestras habían sido congeladas en las siguientes fechas: 1) 07.03.2014; 2) 21.05.2015; 3) 04.07.2014; 4) 13.11.2014; y todas habían tenido un resultado positivo de PRC para VPH cuya tipificación indicó presencia de ADN del serotipo 66. Se descongelaron mediante protocolo de descongelación rápida a temperatura ambiente durante 10 minutos 4 pajuelas por eyaculado: 2 se procesaron mediante swim up directo (SW) para la recuperación de espermatozoides móviles y 2 pajuelas mediante gradientes de densidad (GD) al 40% y 80%. Se determinó la presencia de VPH mediante PCR en las recuperaciones de espermatozoides móviles. En caso de resultar positiva, la detección del producto amplificado se realizó tras electroforesis en agarosa y tinción con bromuro de etidio.

RESULTADOS:

Los resultados de PCR para VPH se describen a continuación. Eyaculado 1 REM GD: Negativo; Eyaculado 1 REM SW: Negativo. Eyaculado 2 REM GD: Negativo; Eyaculado 2 REM SW: Positivo. Eyaculado 3 REM GD: Negativo; Eyaculado 3 REM SW: Positivo. Eyaculado 4 REM GD: Negativo; Eyaculado 4 REM SW: Negativo.

CONCLUSIONES:

La REM mediante swim up directo no parece eliminar la infección del VPH de la muestra de semen. La REM mediante gradientes de densidad parece eliminar la infección de VPH de la muestra de semen. Es necesario realizar estudios con una n mayor para confirmar estos resultados.

P-050 INFLUENCIA DEL PERIODO DE ABSTINENCIA SEXUAL EN RELACIÓN CON LOS CICLOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA. RESULTADOS PRELIMINARES.

M. Mundi Roldan, Z. Larreategui Laiseca, M. Ferrando Serrano
IVI BILBAO, Bilbao, Vizcaya
maria.mundi@ivi.es

INTRODUCCIÓN:

En la actualidad se asume el periodo de abstinencia sexual recomendado por la OMS para realizar las técnicas de reproducción asistida. Sin embargo se sigue intentando relacionar su influencia con diferentes parámetros seminales y determinar el periodo más óptimo para mejorar los resultados de las clínicas.

OBJETIVOS:

Evaluar la influencia del periodo de abstinencia sexual de los varones sometidos a ciclos de RA de donación de ovocitos con los resultados en estos ciclos y los parámetros seminales.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio randomizado y prospectivo en los que participan pacientes normozoospermicos según la OMS y se dividen en dos grupos en función del periodo de abstinencia sexual: 1 día vs 3 días.

El estudio se realiza en pacientes sometidos a tratamientos de FIV/ICSI o ICSI con donación de ovocitos (entre 8 y 15 MII) para evitar la variabilidad debido al gameto femenino. La capacitación del semen se realiza con el protocolo estándar del laboratorio de FIV (Gradientes de densidad de PureSperm 90/45).

Contamos con un total de 300 pacientes en el grupo de abstinencia de 1 día; y 239 en el grupo de abstinencia de 3 días. Estudio realizado entre Septiembre de 2012 y Abril de 2015.

Analizamos:

Las tasas de gestación de los dos grupos obteniendo tasas de gestación similares en los dos grupos de estudio.

Comparamos 2 seminogramas de cada paciente en cada grupo (3 días de abstinencia vs 3 días)(3 días vs 1 día), no observándose diferencias significativas entre grupos.

Estudiamos las calidades embrionarias de ambos grupos, obteniendo que no hay diferencias con respecto a las tasas de fecundación, calidad de los embriones en día 3 de desarrollo, calidades en día 5 de desarrollo o calidades de los embriones transferidos.

Realizamos análisis estadístico de los resultados de los ciclos con el programa SPSS 17.0.

RESULTADOS:

El porcentaje de gestación que presentan los dos grupos de estudios es de 67.1% para abstinencia de 1 día y del 64.4% para abstinencia de 3 días, no existiendo diferencias significativas, por lo que con nuestra experiencia, a diferencia de los datos obtenidos en anteriores estudios, el periodo de abstinencia no influye en los resultados de las tasas de gestación.

Reducir el periodo de abstinencia a 1 día no tiene influencias negativas, ya que no se han encontrado diferencias significativas en la comparación de los seminogramas de los pacientes en ambos grupos.

Para el resto de parámetros analizados comparando los resultados para abstinencia de 1 día frente a la de 3 días: tasas de fecundación (82.49% vs 79.47%), embriones calidad A

transferidos (55.55% vs 52.58%), embriones calidad B transferidos (38.14% vs 32.99%), embriones calidad C transferidos (9.27% vs 9.27%), embriones calidad D transferidos (1% vs 5%). En cuanto al total de embriones: Calidad A (22.25% vs 22.83%), calidad B (29.94 vs 31.31%), calidad C (18.71% vs 18.99%) y calidad D (29.31 vs 26.87). No encontramos diferencias significativas en ninguno de estos parámetros.

CONCLUSIONES:

Los resultados revelan que con mayor número de pacientes, las tasas de gestación de los grupos de abstinencia de 1 y 3 días se igualan, por lo que podemos concluir que el periodo de abstinencia sexual no afecta a las tasas de gestación. Es importante ampliar el estudio para contar con mayor número de pacientes y estudiar el desarrollo embrionario hasta estadio de blastocisto. Realizar un estudio molecular de espermatozoides para determinar si se producen cambios significativos debido al periodo de abstinencia.

BIBLIOGRAFÍA:

Relationship between the duration of sexual abstinence and semen quality: analysis of 9,489 semen samples. Levitas. Fertility and Sterility Vol. 83, No. 6, June 2005.

Influence of the abstinence period on human sperm quality. De Jonge. Fertility and Sterility Vol. 82, No. 1, JULY 2004.

Within- and between-subject variation in semen parameters in infertile men and normal semen donors. Brooks. Fertility and Sterility Vol. 85, No. 1, January 2006.

P-051 PREVALENCIA DE LAS ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL (ETS) EN DONANTES DE OVOCITOS ASINTOMÁTICAS

EM. García Hernández (1), B. Lledó Bosch (1), AM. Fabregat Reolid (1), J. Guerrero Villena (2), J. Giménez Fernández (2), J. Llácer Aparicio (2), R. Bernabéu Pérez (2)

(1) Instituto Bernabeu Biotech, Alicante, (2) Instituto Bernabeu, Alicante.

evagarcia@institutobernabeu.com

INTRODUCCIÓN:

Actualmente existe un claro incremento en la prevalencia de las ETS en la población de países desarrollados. Además, algunos de los microorganismos responsables de estas ETS, como son el *Ureaplasma*, *Chlamydia*, *Mycoplasma* y *Gonorrea*, pueden provocar problemas de fertilidad. Si este tipo de infecciones no se detectan ni se tratan, pueden llegar a producir serias complicaciones en la salud reproductiva.

OBJETIVOS:

El objetivo de nuestro trabajo fue determinar la prevalencia de microorganismos responsables de distintas ETS en la población de donantes de ovocitos de nuestras clínicas de fertilidad.

MATERIAL Y MÉTODOS:

El análisis se llevó a cabo en 267 donantes de ovocitos, incluidas en el programa de donación de la clínica durante el año 2014. Las donantes fueron seleccionadas de acuerdo a los

requisitos del programa de donación de nuestro centro que recoge las principales recomendaciones de la ASRM y la ESHRE.

Para llevar a cabo nuestro objetivo se utilizó una técnica innovadora, mediante microarray (STI- Multiplex Array. Randox-Irlanda), que permite detectar 10 infecciones distintas de ETS en una única prueba, a partir de una muestra cervical. Esta técnica consiste en la extracción del ADN, posterior PCR, e hibridación en un biochip. El revelado final permite identificar las infecciones presentes en la muestra.

Los microorganismos que permite identificar el biochip son los siguientes: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Trichomonas vaginalis*, *Treponema pallidum*, *Herpes simplex virus I y II*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* y *Haemophilus ducreyi*.

RESULTADOS:

Tras el análisis de los diferentes patógenos, obtuvimos una incidencia de

ETS en el grupo de donantes de ovocitos del 29%, del cual un 29.3% mostraron infección por 2 o más ETS.

Los patógenos que mostraron una mayor frecuencia en las donantes fueron *Mycoplasma hominis* (48.8%), *Ureaplasma urealyticum* (40.2%) y *Chlamydia trachomatis* (26.8%). En ninguna se detectó la presencia de *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoea* ni *Herpes simplex virus I y II*.

CONCLUSIONES:

Nuestro estudio reveló una elevada frecuencia de ETS en el grupo de donantes de ovocitos, principalmente *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Chlamydia trachomatis*. Debido a la prevalencia detectada en el grupo de estudio, sería recomendable incluir un cribado de este tipo de enfermedades, previamente al ciclo de donación, con el fin de prevenir la transmisión a la paciente receptora.

P-052 DINÁMICA DE LA EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DEL SISTEMA CANNABINOIDE EN OVOCITOS Y CÉLULAS DE LA GRANULOSA DURANTE LA MADURACIÓN NUCLEAR DE LOS OVOCITOS

E. Agirregoitia Marcos (1), I. Ibarra-Lecue (2), L. Totorikaguena (1), R. Mendoza (3), A. Expósito (3), R. Matorras (3), L. Urigüen (3), N. Agirregoitia (1)

(1) Dep. Fisiología, Fac. Medicina UPV/EHU, (2) Dep Farmacología, Fac Medicina (UPV/EHU), (3) Unidad de Reproducción Humana. Departamento de Obstetricia y Ginecología. Hospital Universitario Cruces UPV/EHU

e.agirregoitia@ehu.es

INTRODUCCIÓN:

El sistema cannabinoide es un sistema lipídico de comunicación celular que ejerce su acción vía receptores unidos a proteínas G (CB1 y CB2). La degradación de los cannabinoides se da gracias a las enzimas degradadoras de cannabinoides (FAAH y MGLL). En los tractos reproductores femenino y masculino se ha descrito la presencia del endocannabinoide anandamida y es sabido que los cannabinoides ejercen su influencia, vía receptor, en la fase de implantación del embrión. Sin embargo, aunque se ha detectado la presencia de componentes del sistema cannabinoide en los folículos femeninos, se sabe poco sobre la dinámica de expresión y localización de los cannabinoides durante la maduración de los gametos femeninos.

OBJETIVOS:

El interés del presente trabajo de investigación se centra, por una parte, en la detección de los receptores de cannabinoides (CB1 y CB2) así como de las enzimas degradadoras de cannabinoides (FAAH y MGLL) en ovocitos humanos y en las células de la granulosa. Por otra parte, nos interesa describir cuál es la localización

espacial de dichas proteínas durante las diferentes fases de maduración ovocitaria: vesícula germinal (GV), metafase I (MI) y metafase II (MII).

MATERIAL Y MÉTODOS:

En el estudio se incluyeron ovocitos y células de la granulosa de pacientes pertenecientes al programa de reproducción asistida (FIV/ICSI) de la Unidad de Reproducción Humana del Hospital. Estas pacientes se sometieron a un protocolo de hiperestimulación folicular controlada. La presencia de los componentes del sistema cannabinoide se analizó a varios niveles mediante tres técnicas: 1) RT-PCR (para la detección de los mRNA), 2) Inmunoblotting (para la detección de las proteínas) y 3) Inmunocitoquímica (para la localización celular de las proteínas en las diferentes fases de maduración del ovocito).

RESULTADOS:

Los resultados dejan en evidencia la presencia del sistema cannabinoide en los ovocitos humanos y en las células de la granulosa. La localización de cada receptor y de cada enzima de degradación varía en el ovocito durante la maduración de éste pero, dicha localización no varía en las células

de la granulosa provenientes de esos ovocitos. Cabe destacar que el receptor CB1 colocaliza con la FAAH en la fase de GV y MI pero en la fase de MII, donde el CB1 se mantiene en la periferia, la FAAH se internaliza. La MGLL mantiene una localización citosólica durante todo el proceso de maduración. En las células de la granulosa el CB1 también es el receptor más importante ya que, según nuestros resultados, no podemos afirmar la presencia de CB2. Aun así, en las células de la granulosa provenientes de ovocitos de cada fase madurativa no encontramos cambios en la localización de cada componente. En ese sentido, CB1 se localiza en la membrana celular mientras las enzimas tienen una localización más citosólica.

CONCLUSIONES:

La presencia de los componentes del sistema cannabinoide en ovocitos humanos y células de la granulosa hace pensar en una posible acción de estas moléculas, vía receptor, en la maduración del gameto. Por otra parte, la distinta localización de cada componente en las diferentes fases de maduración nos indica que es un proceso dinámico y coordinado.

P-053 MORFOCINETICA Y ESTADO NUCLEAR EN EMBRIONES COMO MARCADORES DE POTENCIAL IMPLANTATORIO.

J. Aguilar Prieto (1), E. Muñoz Muñoz (1), M. Pérez Fernández (1), E. Taboas Lima (1), T. Vilorio (2), A. Delgado (2), M. Meseguer (2)
 (1) IVI VIGO, Vigo, Pontevedra, (2) IVI Valencia, Valencia
jesus.aguilar@ivi.es

INTRODUCCIÓN:

La multinucleación es una de las anomalías más frecuente en los embriones generados en el laboratorio. Tradicionalmente se ha considerado un factor de desección embrionaria, si bien la mayoría de los estudios realizados han sido con observaciones estáticas y existe poca información relativa a su prevalencia, reversibilidad y morfocinética de los embriones multinucleados.

OBJETIVOS:

Estudiar el estado nuclear de embriones humanos in vitro durante el Segundo ciclo celular (dos y cuatro células), el efecto de la nucleación en el estadio de dos células sobre la tasa de implantación, la reversibilidad de la multinucleación en estadio de cuatro células y la morfocinética y su relación con la tasa de implantación.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo observacional realizado en IVI Vigo e IVI Valencia entre enero 2011 y diciembre 2013. 1679 embriones cultivados en un incubador con monitorización time lapse en una atmósfera de incubación de 37°C, 6% CO₂ y 20% de O₂ procedentes de 940 ciclos de donación de ovocitos fueron analizados. El tiempo exacto de los eventos celulares fue evaluado en horas

desde el momento de la microinyección

El estado de nucleación fue anotado de acuerdo con el número de núcleos presente en cada blastómera en embriones de dos y cuatro células como se detalla:

nMONO (mononucleadas) donde "n" representa el número de blastómeras en las que un único núcleo es visible.

nBI (binucleadas) número de blastómeras en el que dos núcleos por célula son visibles.

nMULTI (multinucleadas) número de blastómeras en donde el número de núcleos visibles es mayor de dos. En esta definición se incluye la micronucleación.

El tiempo de cada división embrionaria se define como t₂(tiempo a 2 células), t₃ (3 células), t₄ (4 células), t₅(5 células), t₈(8 células); cc₂=t₃-t₂; cc₃=t₅-t₃; s₂=t₄-t₃; s₃=t₈-t₅

El test ANOVA y χ^2 -fueron empleados para evaluar la influencia de la morfocinética de la multinucleación en la tasa de implantación.

RESULTADOS:

De 1602 embriones analizados, 40.08% mostraron multinucleación en 2 células, mientras que estuvo presente en el 14,4% de los embriones de 4

células. No se encontraron diferencias significativas en la tasa de implantación entre embriones mononucleados y multinucleados (una o ambas blastómeras), después de analizar la multinucleación en el estadio de dos células (p=0,07), por el contrario, sí existen al considerarse multinucleación en el estadio de 4 células (p<0,001). Hay diferencias significativas en los parámetros cc₂, cc₃, t₂, t₃, t₄, t₅ entre los embriones multinucleados (BI o MULTI) en el estadio de dos células y los mononucleados. Únicamente t₄ mostró diferencias entre embriones multinucleados y no multinucleados en el estadio de 4 células.

CONCLUSIONES:

De acuerdo con los datos presentados, la multinucleación parece ser un fenómeno frecuente y transitorio en el desarrollo embrionario. Tiene un efecto perjudicial en la implantación embrionaria cuando las blastómeras están multinucleadas en el estadio de 4 células, mientras que no lo tiene al considerarse en el estadio de dos células. Los parámetros morfocinéticos son estadísticamente diferentes cuando la multinucleación está presente en el estadio de dos células, lo cual debería ser tenido en cuenta para el desarrollo de algoritmos de selección embrionaria, y teniendo en cuenta su efecto no perjudicial en la implantación embrionaria.

P-054 EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL APLICADO AL SÍNDROME DEL X FRÁGIL

C. Hernández García, MD. Lozano Arana, B. Sánchez Andújar, R. Fernández García, A. Peciña López, JC. García Lozano, S. Borrego López, G. Antiñolo Gil
Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla
conaryhernandez@gamil.com

INTRODUCCIÓN:

El Síndrome de X frágil (FRAX) es la causa hereditaria monogénica de discapacidad intelectual más frecuente y está causado por la expansión anómala de un triplete inestable CGG en el gen FMR1 localizado en el Xq27.3. Una mutación completa se define como >200 repeticiones de CGG resultando afectos todos los hombres que la portan y un número variable de mujeres en función de la inactivación del cromosoma X. Mientras que un número normal de repeticiones (6-40) se transmite de padres a hijos de una manera estable, las portadoras entre 55-200 repeticiones (premutación) corren el riesgo de transmitir a su descendencia este segmento inestable que puede expandirse dando lugar a una mutación completa y un hijo afecto. A todas las portadoras de mutación o premutación para FRAX se debe ofrecer consejo reproductivo. El Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) para FRAX es una estrategia alternativa al diagnóstico prenatal tradicional cuyo procedimiento presenta cierta complejidad además de algunas particularidades. Hay evidencia creciente de que las portadoras de premutación en FMR1 tienen una importante disminución de la reserva ovárica. El fallo ovárico precoz se produce en un 10-28% de estas pacientes en comparación con 1% de la población general. La respuesta subóptima a la estimulación ovárica puede resultar en un menor número de ovocitos, embriones disponibles para el diagnóstico y en las tasas de embarazo.

OBJETIVOS:

Evaluación de los resultados obtenidos en nuestra Unidad del DGP aplicado a FRAX.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se les realizó DGP-FRAX a un total de 11 parejas entre los años 2010 y 2014. Tras protocolo habitual de estimulación ovárica controlada, recuperación de ovocitos y posterior ICSI se realizó biopsia de blastómera en día +3 de los embriones aptos y se llevó a cabo el diagnóstico genético mediante estudio indirecto con marcadores microsatélites intragénicos ubicados en las regiones flanqueantes al gen FMR1. El método molecular utilizado es un protocolo optimizado en nuestra Unidad consistente en una PCR-fluorescente múltiple que permite la amplificación simultánea de hasta 6 marcadores diferentes. A continuación, se realiza la electroforesis capilar y el análisis del electroferograma para identificar la presencia o ausencia de la combinación de marcadores asociada a la expansión en el gen FMR1. En dos de los casos se aplicó previamente la técnica de MDA (Multiple Displacement Amplification) para amplificación del genoma completo, debido a circunstancias especialmente complejas de los mismos.

RESULTADOS:

Se realizaron un total de 15 ciclos, en mujeres con una media de edad de 32 años, recuperándose 87 ovocitos

maduros (media 5.8, mediana 4), con una tasa de fecundación del 63.21%. Es notable que en 5 de los 15 ciclos puncionados (33.33%) no hubo embriones para biopsiar (4 por ausencia de fecundación y 1 por mala calidad embrionaria). En los 10 ciclos restantes se obtuvieron un total de 55 embriones, a 43 de los cuales se les realizó biopsia (78.18%). El 86.05% (37 embriones) fueron diagnosticados con éxito. La tasa de transferencia por ciclo puncionado fue 46.67%. La tasa de gestación clínica por ciclo puncionado fue del 13.33% (2 gestaciones) y por ciclo transferido del 28.57%. Ambas gestaciones llegaron a término, resultando 2 recién nacidos vivos y sanos.

CONCLUSIONES:

Nuestro resultados muestran una baja respuesta a la estimulación ovárica en las mujeres portadoras de FRAX (media: 5.8 ovocitos maduros/ciclo) en comparación con las obtenidas para ciclos de DGP en otras patologías (media: 10.5 ovocitos maduros/ciclo), y en consonancia con la disminución de la reserva ovárica previamente reportado para estas mujeres. Esto se traduce en bajas tasas de transferencia (46.67% para DGP-FRAX frente a 61.9% habitual en otras patologías) y de nacidos vivos por ciclo puncionado. Sin embargo, cuando la transferencia de embriones es posible, los resultados son comparables con los obtenidos con el DGP para otras enfermedades monogénicas.

P-055 RESULTADOS PERINATALES Y OBSTÉTRICOS EN NACIDOS VIVOS ÚNICOS PROCEDENTES DE FECUNDACIÓN IN VITRO. COMPARACIÓN ENTRE CICLOS DE CRIOTRANSFERENCIAS Y TRANSFERENCIAS DE EMBRIONES EN FRESCO.

S. Cívico Vallejos, O. Herrera Osorio, F. Fàbregues Gasol, E. Vidal Sordé, V. Moreno Folch, J. Balasch Cortina
Hospital Clínic Barcelona
scivico@clinic.ub.es

INTRODUCCIÓN:

Las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) se han asociado con algunos resultados perinatales adversos, como el parto pre término y el bajo peso, menos frecuentes tras la concepción espontánea. Estos resultados, se han relacionado con la estimulación ovárica para FIV, con modificaciones epigénéticas, que podrían estar vinculadas a la propia técnica, o con los efectos de la criopreservación o el cultivo prolongado de los embriones in vitro. Contrariamente a lo que cabría esperar, teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, algunos estudios recientes señalan que esos resultados adversos son inferiores en los niños nacidos tras transferencia de embriones criopreservados en comparación con los niños nacidos tras transferencia de embriones en fresco.

OBJETIVOS:

Valorar si existen diferencias entre los resultados perinatales de los nacidos vivos únicos tras Criotransferencia (CT) y los nacidos por Transferencias de Embriones frescos (TEF) en nuestro centro.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo de 1129 nacidos vivos únicos mediante FIV en nuestro

centro, entre Enero de 2006 y Diciembre de 2012. Se estudiaron los datos obstétricos de 169 nacidos únicos procedentes de CT y de 960 procedentes de TEF. Las características de la madre y los resultados perinatales y obstétricos fueron analizados.

RESULTADOS:

Las características de la madre en cuanto a edad, índice de masa corporal (BMI), consumo de tabaco, tipo de esterilidad, y número de embriones transferidos fueron comparables. El peso medio del recién nacido y la edad gestacional media fueron más altos en los nacidos tras CT (3391.9g \pm 51.7 vs 3163.5g \pm 50.4; 39.4 SG \pm 1.6 vs 38.9 SG \pm 3.1; p<0.05). Los nacidos tras CT presentaron menor tasa de gestación pre término (PTB <37 sem.) y peso al nacimiento (LBW < 2500g) que tras TEF (3.05% vs 7.08%; 4.7% vs 8.7%; p<0.05). La tasa de nacimiento post término (>41 SG) fue más alta en CT que en TEF (32.5% vs 1.6%; p<0.001) y el porcentaje de recién nacidos con macrosomía (\geq 4000g) también fue superior en las CT (9.4% vs 3.1%; p<0.001). Incidencias obstétricas - Trastornos Hipertensivos del embarazo (PIH), Diabetes Gestacional, Placenta Previa, Desprendimiento de Placenta, Retraso Crecimiento Uterino (IUGR) y Amenaza de Parto Prematuro - fueron similares en ambos grupos. También las

Anomalías Congénitas fueron similares en los dos grupos.

CONCLUSIONES:

Los resultados perinatales obtenidos en los niños nacidos de ciclos de CT son mejores en cuanto a peso al nacer y tasa de prematuridad, respecto a los resultados de los niños nacidos de TEF en un ciclo de FIV con estimulación ovárica.

BIBLIOGRAFÍA:

Pinborg A et al. Why do singletons conceived after assisted reproduction technology have adverse perinatal outcome- Systematic review and meta-analysis. *Human Reprod Update* 2013; 19:87-104.

Wennerholm U-B et al. Perinatal outcomes of children born after frozen-thawed embryo transfer: a Nordic cohort study from the CoNARTaS group. *Human Reprod* 2013; 9:2545-2553.

Li Z et al. Clinical outcomes following cryopreservation of blastocyst by vitrification or slow freezing: a population-based cohort study. *Human Reprod* 2014; 12:2794-801.

P-056 COMPARACIÓN ENTRE DOS SISTEMAS CERRADOS DE VITRIFICACIÓN: CRYOTIP VS SAFESPEED

S. Delgado Muñoz, G. Bueno Rodríguez, C. Aranda, M. Lucena Campos
Complejo Hospitalario Universitario, Huelva
sonia.delgado2@andaluciajunta.es

INTRODUCCIÓN:

La criopreservación de embriones humanos ha contribuido en gran medida al desarrollo de las técnicas de reproducción asistida. En un principio la congelación lenta era la única alternativa existente para poder almacenar embriones. En la actualidad, la vitrificación es la técnica más extendida para la criopreservación tanto de óvulos como de embriones en cualquier estadio. La vitrificación consiste en un método de preservación con el cual se minimiza (o se elimina) la posibilidad de formación de cristales de hielo tanto extra como intracelulares que pueden dañar las estructuras celulares. Para ello se requiere del uso de crioprotectores a altas concentraciones que junto con una alta velocidad de enfriamiento hacen que la muestra solidifique de manera amorfa evitando la cristalización.

Otro factor determinante en la supervivencia del embrión es el soporte que se utilice. Existen dos tipos de soportes principales: el abierto y el cerrado. El sistema abierto es aquel en el que la muestra se sumerge directamente en nitrógeno líquido con lo que conseguimos una alta velocidad de enfriamiento. Y el sistema cerrado es aquel que aísla la muestra y evita el contacto directo con el nitrógeno líquido con lo que se reduce el riesgo de contaminación cruzada.

La valoración del soporte es muy importante, ya que debe asegurar la supervivencia y viabilidad del embrión.

OBJETIVOS:

Comparar las tasas de supervivencia y de embarazo tras la desvitrificación entre dos sistemas cerrados Cryotip (IrvineScientific®) y SafeSpeed (SafePreservation®).

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se realizaron un total de 82 ciclos de criotransferencias desde Junio del 2014 hasta Marzo del 2015. Un total de 172 embriones fueron desvitrificados, 104 fueron vitrificados con el sistema cerrado Cryotip (47 ciclos) y 68 con el sistema cerrado Safespeed (35 ciclos). De los 172 embriones desvitrificados, 130 fueron transferidos; 74 embriones procedentes de pajuelas Cryotip y 56 embriones procedentes de pajuelas SafeSpeed.

Los medios de vitrificación y recalentamiento usados son Vitrification Freeze Kit y vitrification Thaw Kit (IrvineScientific®).

RESULTADOS:

Con el sistema Cryotip obtuvimos 10 embarazos con una tasa de embarazo/ciclo de 21.27% y tasa de supervivencia de 71.15%. Con el sistema SafeSpeed

obtuvimos 11 embarazos con una tasa de embarazo/ciclo de 31,42% y tasa de supervivencia del 82,35%. Siendo la muestra estadística aun reducida, el margen de confianza que podemos dar a la superioridad del método SafeSpeed sobre Cryotip es entorno al 78%. Sin embargo, todo apunta a que con una estadística ligeramente superior (trabajos en cursos), podamos afirmar con un margen de confianza por encima del 95%, la superioridad del SafeSpeed.

CONCLUSIONES:

SafeSpeed en un sistema cerrado que permite tanto la vitrificación de óvulos como de embriones. Cryotip ha demostrado históricamente su eficiencia en embriones, pero no ha resultado tradicionalmente exitoso en ovocitos. Con este trabajo se pretende poner de manifiesto la superioridad del método SafeSpeed también en el caso de embriones. Dado lo reducido de la estadística, el margen de confianza de esta afirmación es una indicación de hacia dónde apunta la tendencia en el caso de un aumento de la población bajo estudio.

P-057 RESULTADOS OBTENIDOS EN LA APLICACIÓN DEL CRIBADO PRECONCEPCIONAL EN MÁS DE 9000 INDIVIDUOS

E. Alsina Xiol(1 y 3), E. Garcia Guixé(1), C. Giménez Sevilla(1), S. Yamal (2), N. Kumar(2), A. Bisignano(2), J. Horcajadas (3), M. Sandalinas Alabert(3)

(1) Reprogenetics Spain, (2) Recombine, (3) Recombine Europe
elia@recombine.com

INTRODUCCIÓN:

El cribado de portadores permite reducir el riesgo de transmisión de enfermedades genéticas recesivas y ligadas al sexo. Los individuos portadores de este tipo de enfermedades son asintomáticos pero si dos miembros de una pareja presentan mutaciones en el mismo gen causante de la enfermedad tienen un elevado riesgo de tener descendencia afectada (25%). En el caso de enfermedades ligadas al sexo el riesgo es del 50% y afecta a los varones. Gracias a los vertiginosos avances de la genética molecular en la actualidad nos es posible llevar a cabo un cribado de portadores para más de 250 enfermedades en un solo test.

OBJETIVOS:

Estudio descriptivo de la frecuencia obtenida de individuos portadores para las enfermedades autosómicas recesivas y ligadas al sexo incluidas en el test utilizado para parejas y donantes de gametos a los que se les ha aplicado el cribado genético.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se han analizado hasta 255 enfermedades genéticas recesivas en un total de 8511 individuos mediante

Illumina® Infinium HD Genotyping Platform. La frecuencia de individuos portadores se ha analizado en global, por grupo étnico así como por enfermedad. Se han analizado por separado los datos correspondientes a 625 donantes de ovocitos.

RESULTADOS:

El 42.2% de los individuos analizados resultó ser portador de al menos una mutación. De entre las enfermedades genéticas detectadas, las que presentaban una frecuencia más elevada fueron el Déficit de Biotinidasa (10.7%), la Pérdida de Audición No Sindrómica y Sordera (9.2%), la Fibrosis Quística (6.9%) y la Fiebre Mediterránea Familiar (5.6%).

Respecto a la población de donantes de ovocitos estudiada, el 33% resultó ser portadora de al menos una mutación. Las enfermedades más frecuentes observadas en esta población fueron el Déficit de Biotinidasa (20.9%), la Pérdida de Audición No Sindrómica y Sordera (7.6%), el Déficit de Pseudocolinesterasa (6.6%) y la Enfermedad de Stargardt (6.6%). No se detectó ninguna donante portadora de un alelo expandido para el síndrome de X-frágil pero el 2.6% de las donantes analizadas presentaron un alelo intermedio.

CONCLUSIONES:

En este estudio se ha observado que la frecuencia de enfermedades detectada difiere de las frecuencias teóricas descritas. La homogenización de la población debida a la mezcla de los diferentes grupos étnicos conduce al incremento de la diversidad genética. El cribado de portadores permite reducir el riesgo de transmisión de enfermedades. El análisis simultáneo de mutaciones para más de 200 enfermedades en un diagnóstico preconcepcional permite que parejas que comparten mutaciones para la misma enfermedad puedan minimizar su riesgo reproductivo y evaluar las posibles vías para poder tener descendencia sana (Diagnóstico genético preimplantacional, donación de gametos, adopción, etc.). El cribado de portadores está indicado en parejas que desean concebir, bien de forma natural o a través de técnicas de Reproducción Asistida. En este contexto, la introducción del cribado de portadores en un programa de donación permite minimizar el riesgo residual de enfermedades genéticas en los embriones de las parejas receptoras de gametos.

P-058 APLICACIÓN DE LA NEXT GENERATION SEQUENCING PARA DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL DE ANEUPLOIDÍAS

M. Sandalinas Alabert (1), S. Tormasi (2), C. Giménez (3), P. Colls (4), D. Wells (5), S. Munné (5)

(1) Reprogenetics Spain, (2) Reprogenetics Los Angeles, USA, (3) Reprogenetics Spain, (4) Reprogenetics, Livingston, USA, (5) Reprogenetics UK, Oxford, UK

msandalinas@reprogenetics.es

INTRODUCCIÓN:

Estudios randomizados recientes indican que la aplicación del screening de aneuploidía mediante el análisis de todos los cromosomas en embriones preimplantacionales mejora los resultados de FIV.

OBJETIVOS:

Evaluación de la aplicabilidad de la técnica de NGS (Next Generation Sequencing) para el análisis de todos los cromosomas en un contexto clínico.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se analizaron mediante NGS un total de 844 embriones (166 ciclos de DGP de aneuploidía). Los embriones se

biopsiaron en día 5 o 6 de desarrollo embrionario y se vitrificaron para transferencia en ciclo diferido. Las biopsias de trofoectodermo se analizaron mediante NGS en un secuenciador MiSeq siguiendo el protocolo Veriseq (Illumina, USA). La interpretación de los resultados se llevó a cabo mediante el software BlueFuse Multi(Illumina).

RESULTADOS:

Los resultados se muestran en la tabla siguiente: (en documento Adjunto).

CONCLUSIONES:

La técnica de NGS es aplicable para DGP de aneuploidías en un contexto clínico pero requiere vitrificación y

transferencia en ciclo diferido debido al tiempo requerido para aplicar el laborioso protocolo. En este estudio se obtuvieron resultados en la mayoría de las muestras analizadas. La principal ventaja de la NGS es que permite diagnosticar con más precisión el porcentaje de mosaicismo presente en la muestra analizada, a diferencia del resto de técnicas empleadas para el análisis de aneuploidía. El 10.4% de los embriones analizados presentaba solo anomalía cromosómica en mosaico (pérdida o ganancia).

Los embriones mosaico presentan mayor riesgo de aborto por lo que su diagnóstico ofrece una mayor selección embrionaria.

	Nº embriones	% embriones
Total	844	
Resultado	824	97,6
Euploide	344	41,7
Anormal Complejo (≥ 3 anomalías, incluyendo mosaicos)	112	13,6
Anormal (± 2 cromosomas)	229	27,8
Mosaico (1cr)	54	6,6
Mosaico (2cr)	16	1,9
Total Mosaicos	70	8,5
Parcial (1cr)	39	4,7
Parcial mosaico (1cr)	30	3,6
Total Parciales	69	8,4
DNA deg/No resultado	20	2,4

P-059 VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS: COMPARACIÓN SUPERVIVENCIA EN SISTEMA CERRADO (SAFESPEED) BASADA EN RECALENTAMIENTO ULTRA-RÁPIDO, CON SUPERVIVENCIA EN SISTEMA ABIERTO (CRYOLEAF) BASADA EN ENFRIAMIENTO ULTRA-RÁPIDO.

MA. Vilches Ferrón (1), R. Risco Delgado (2), J. Tubios Fabios (3)

(1) Hospital Torrecardenas, Almería, (2) Universidad de Sevilla, Sevilla, (3) SAFEPRESERVATION, Sevilla

mangel.vilches.sspa@juntadeandalucia.es

INTRODUCCIÓN:

En la actualidad, los soportes para realizar la vitrificación se dividen en dos grandes conjuntos: soportes abiertos y soportes cerrados. Los soportes cerrados solo han mostrado su efectividad en el caso de embriones, obteniéndose siempre, en el caso de ovocitos, unas bajas tasas de recuperación. En los últimos tres años, sin embargo, un nuevo concepto en vitrificación ha aparecido, demostrándose que incluso para velocidades de enfriamiento tan bajas como 95 °C/min se pueden tener tasas de recuperación cercanas al 100% en el caso de ovocitos de ratón, siempre y cuando el recalentamiento se haga a unas velocidades ultra altas. En este estudio se ha comprobado la hipótesis de la superioridad de la optimización de ambas velocidades (tanto de enfriamiento como, sobre todo, de recalentamiento) mediante el uso de SafeSpeed, frente a la tradicional hipótesis de enfriamiento ultra-rápido ofrecida por soportes abiertos, en nuestro caso, Cryoleaf. Aun cuando aún la población bajo estudio es reducida, los resultados son un evidente altísimo rendimiento del sistema cerrado SafeSpeed para la vitrificación de ovocitos.

OBJETIVOS:

Comprobar la hipótesis de superioridad de optimización tanto de velocidad de enfriamiento como, sobre todo, velocidad de recalentamiento ofrecida

por el sistema cerrado SafeSpeed, frente a la optimización solo de velocidad de enfriamiento, ofrecida por sistema abierto Cryoleaf.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Un total de 146 ovocitos que no llegaron a fecundar tras ICSI o FIV fueron vitrificados y recalentados usando dos tipos de soportes: abierto (Cryoleaf) o cerrado (SafeSpeed) y dos tipos de medios: con albumina (Origio) o completamente sintético (SafePreservation).

Los ovocitos fueron divididos en cuatro grupos, atendiendo al tipo de soporte y medio.

Grupo A (control): soporte Cryoleaf, medio Origio. Se uso como grupo control por ser la técnica de vitrificación que se había venido usando en el centro con anterioridad.

Grupo B (experimental): soporte SafeSpeed, medio Origio.

Grupo C (experimental): soporte Cryoleaf, medio SafePreservation.

Grupo D (experimental): soporte SafeSpeed, medio SafePreservation.

RESULTADOS:

Los datos de la supervivencia en los cuatro grupos, expresados como (Soporte, Medio de vitrificación)

fueron:

Grupo A (Cryoleaf, Origio): 58% (0 horas); 51% (3 horas), 49% (24 horas).

Grupo B (SafeSpeed, Origio): 79% (0 horas); 79% (3 horas), 70% (24 horas).

Grupo C (Cryoleaf, SafePreservation): 50% (0 horas), 50% (3 horas), 50% (24 horas).

Grupo D (SafeSpeed, SafePreservation): 82% (0 horas), 82% (3 horas), 82% (24 horas).

CONCLUSIONES:

La vitrificación en sistema cerrado SafeSpeed, que optimiza la velocidad de recalentamiento (no la velocidad de enfriamiento, como ocurre con los sistemas abiertos), se ha mostrado claramente superior en el caso de ovocitos. La optimización de la velocidad de recalentamiento ya fue probada con éxito por otros grupos en el caso de ovocitos de ratón. Esto son los primeros experimentos con ovocitos humanos que también muestran la ventaja de esta aproximación y su capacidad para obtener tasas de supervivencia en vitrificación de ovocitos iguales o superiores a las de los sistemas abiertos.

P-060 VALIDACION CLINICA DEL ESTUDIO DE PORTADORES DE ENFERMEDADES HEREDITARIAS POR SECUENCIACION MASIVA: ESTUDIO GENETICO PRECONCEPCION DE MAS DE 30.000 MUTACIONES CAUSALES.

X. Vendrell Montón, V. Fernandez-Pedrosa, J C. Trivino Pardo, M. Pardo-Belenguer, C. Collado Mico, G. Marco Puche, R. Bautista-Llacer
Sistemas Genómicos, Paterna, Valencia
javier.vendrell@sistemasgenomicos.com

INTRODUCCIÓN:

Las técnicas de secuenciación masiva (NGS, Next Generation Sequencing) permiten acceder a la secuencia de un genoma de forma rápida, automática y en varias muestras simultáneamente. En el campo de la Genética Reproductiva se están implementando en estudios como el DGP de aneuploidías, el diagnóstico prenatal en sangre materna y, más recientemente, en los paneles de estudio de portadores de enfermedades hereditarias, conocidos como “estudios preconcepción”, tanto en donantes de gametos como en parejas con deseo reproductivo. El desarrollo de un panel de estudio de determinados genes, asociados a enfermedades concretas, requiere la combinación de aparatos, reactivos y algoritmos bioinformáticos que deben ser validados necesariamente por los laboratorios de Genética, antes de utilizarlos como una herramienta diagnóstica o de cribado. En términos estrictos, la validación implica: i) la fase de desarrollo del análisis: selección de genes, modalidad de la técnica NGS, establecimiento de la cobertura, umbrales de análisis y protocolos; ii) la fase de validación *per se*: determinación de la sensibilidad, especificidad, precisión y reproducibilidad; y iii) la calidad del ensayo: control de calidad y competencia técnica.

OBJETIVOS:

Presentar la validación del estudio simultáneo de 33.333 mutaciones causales, en 320 genes, responsables de 344 enfermedades hereditarias (318 autosómicas recesivas y 26 ligadas al cromosoma X).

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se estudiaron 10 genomas procedentes de pacientes del programa de DGP de enfermedades monogénicas, y dos líneas celulares controladas adquiridas en el repositorio celular de la Universidad de Coriell [<http://ccr.coriell.org/>] y caracterizadas mediante genotipado masivo por arrays por el consorcio “HapMap” [<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>] y por NGS por el consorcio de “1000 Genomes” [www.1000genomes.org]. Las muestras se estudiaron de forma ciega, por duplicado, por dos personas y en fechas distintas. El diseño se basó en la modalidad de captura (resecuenciación dirigida). Concretamente, las regiones diana del diseño capturaron 27.341 cambios de un solo nucleótido, 5.177 deleciones, 519 indels y 296 inserciones. Las mutaciones están situadas en exones, intrones, regiones colindantes exón/intrón, elementos reguladores y zonas flanqueantes. Las 33.333 mutaciones interrogadas están descritas como patológicas en la Human Gene Mutation Database v.2014.4 (HGMD™).

La calidad/cantidad del ADN se estimó por absorbancia, fluorescencia y electroforesis. Se construyeron librerías de fragmentos compatibles con la plataforma de secuenciación Illumina. El enriquecimiento en las regiones diana se realizó mediante hibridación en solución de las librerías, con sondas biotiniladas y captura con microesferas cubiertas de estreptavidina. El ADN capturado se amplificó por PCR y se etiquetó añadiendo secuencias específicas. La calidad/cantidad se valoró en Qubit® y Bioanalyzer®. La mezcla equimolar se secuenció mediante

SBS (Sequencing by Synthesis) y paired-ends (longitud de 100 nucleótidos x2) en la plataforma MiSeq® (Illumina). Las lecturas fueron mapeadas frente al genoma Hg19 (algoritmo BWA).

RESULTADOS:

Las bases con $q > 30$ fueron $> 90\%$. Se estimaron los siguientes porcentajes: lecturas mapeadas ($> 98\%$), lecturas propiamente emparejadas (properly-pair, $> 95\%$), lecturas eliminadas por baja calidad de mapeo ($> 97\%$) y por duplicados de PCR ($> 90\%$), lecturas on target ($> 55\%$), bases cubiertas y nucleótidos mapeables en las zonas diana ($> 60\%$). Se definieron: Discordant True Positives (DTP), Concordant True Positives (CTP), False Negatives (FN), True Negatives (TN), True False Positives (TFP), Annotated (A), True Positives (TP) y False Positives (FP). En base a estas variables se calcularon la sensibilidad ($TP / (TP + FN)$, $> 99\%$), especificidad ($TN / (TN + FP)$, $> 99\%$), precisión ($TP / (TP + FP)$, $> 90\%$), $tasaFP = 1 - precision$ y $tasaFN = 1 - sensibilidad$. Todos los parámetros superaron ampliamente los valores de corte.

CONCLUSIONES:

La aplicación de la NGS en el panel de captura diseñado, rinde resultados sensibles, específicos, precisos y reproducibles. Esto lo convierte en un ensayo validado para la detección de mutaciones causales en cualquier región de los genes estudiados. Además, evita la incertidumbre que genera el estudio de variantes de significado desconocido, contraindicadas en los programas de cribado genético de individuos asintomáticos.

P-061 ANALISIS DE SUPERVIVENCIA EMBRIONARIA EN CULTIVOS CON O SIN BAJA PRESION DE OXIGENO EN UN SISTEMA TIME-LAPSE.

LM. Rodríguez Menes, F. Graña Zanon, D. Llana Suárez, V. Sánchez Blasco, JC. Quintana Paunette, E. García Álvarez, AP. Llana Coto, PE. De La Fuente Ciruelas, C. García-Ochoa Del Fresno
CEFIVA, Oviedo, Asturias
luz@cefiva.com

INTRODUCCIÓN:

Estudios con modelos animales han evidenciado que las condiciones fisiológicas en el oviducto tienen un rango entre el 5-7% de O₂, en cambio, en el útero se encuentran entorno al 2%. Numerosos trabajos corroboran un efecto favorable en el cultivo de baja presión de O₂, sobre todo en el desarrollo a la etapa de blastocisto.

OBJETIVOS:

El objetivo de éste estudio ha sido el evaluar las curvas de supervivencia de los embriones desde el momento de la ICSI hasta el estadio de blastocisto, comparando los cultivos al 20% de O₂ y al 5% en un sistema time-lapse (Embryoscope).

MATERIAL Y MÉTODOS:

Hemos realizado un estudio retrospectivo evaluando 905 embriones en cultivo al 20% de O₂ desde enero de 2012 hasta mayo de 2013 fecha en la cual comenzamos el cultivo de los embriones al 5% de O₂ analizando 922 hasta enero de 2015. Ambos grupos son homogéneos en cuanto a la edad de las pacientes, técnica e indicación. Se han calculado las tablas de vida y curvas de supervivencia mediante el método actuarial, más sencillo de interpretar, y por el método de Kaplan-Meier, que

cuenta con mejor resolución temporal. La gráfica de abajo corresponde a este último método. El evento terminal en este caso, no corresponde con la muerte del embrión, sino con ser desechado por cualquier motivo. El hecho de que los datos censurados correspondan a embriones que se transfieren o congelan (embriones de buena calidad), hace que la tasa de supervivencia esté ligeramente subestimada, en todo caso esto ocurre en los dos tipos de cultivo.

RESULTADOS:

Cómo podemos observar en la gráfica, obtenemos una mayor tasa de supervivencia en los embriones cultivados con baja presión de O₂. La mortalidad se incrementa mucho al aproximarse a la hora 70, donde observamos un punto de inflexión, en ambos grupos, en el que la mortalidad vuelve a descender.

CONCLUSIONES:

Observando la gráfica encontramos que el grupo en el que se cultivaron los embriones con baja presión de O₂, es más beneficioso para el desarrollo embrionario, y podemos ver su efecto más claramente en las primeras 70 horas, éste momento podemos suponer que coincide con el momento en que el embrión comienza a expresar su material genético, hasta entonces sólo

puede responder a las "agresiones" externas mediante el transcriptoma presente ya en el ovocito, que parece que le favorece más el cultivo con baja presión de O₂.

A partir de las 70 horas las curvas son muy similares, estando por debajo la curva de cultivo con concentración de O₂ normal, simplemente por lastre arrastrado de las primeras horas de cultivo.

BIBLIOGRAFÍA:

- Kirstine Kirkegaard, M.D., Johnny Hindkjaer, M.Sc. and Hans Jakob Ingerslev, D.M.Sc. Effect of oxygen concentration on human embryo development evaluated by time-lapse monitoring. *Fertility and Sterility* 2013; 738-744.
- B. Kovacic, V. Vlaisavijevic. Influence of atmospheric versus reduced oxygen concentration on development of human blastocysts in vitro: a retrospective study on sibling oocytes. *Reproductive BioMedicine Online* 2008; 17; 229-236.
- Y. Franco, M.J. Lázaro, P. Rodríguez, E. Ortiz, M. García. La influencia del cultivo a bajas concentraciones de Oxígeno mejora el desarrollo de implantación de los blastocistos. *Congreso ASEBIR 2011. Revista ASEBIR vol 16, 214.*

P-062 VALORAR LA MORFOLOGIA EMBRIONARIA EN DIA 2 NO APORTA BENEFICIOS A LOS RESULTADOS REPRODUCTIVOS EN LOS CICLOS DE ICSI: RESULTADOS DE UN ESTUDIO PROSPECTIVO RANDOMIZADO

MI. Rodríguez, A. Obradors, A. Pujol, V. Vernaeva, R. Vassena
Clínica EUGIN, Barcelona
rvassena@eugin.es

INTRODUCCIÓN:

La evaluación morfológica de los embriones en día 2 se usa frecuentemente junto con la valoración en día 3, para obtener mayor información acerca de la velocidad de desarrollo y el tiempo de división y así facilitar la selección de los embriones a transferir. Sin embargo, los métodos habituales de evaluación en día 2 implican la exposición de los embriones a condiciones ambientales desfavorables.

OBJETIVOS:

Averiguar, mediante un estudio prospectivo randomizado, el efecto añadido que tiene la valoración morfológica en día 2 de desarrollo sobre los resultados reproductivos en ciclos de ICSI en los que se realiza la transferencia embrionaria en día 3.

MATERIAL Y MÉTODOS:

En este estudio se han incluido 1506 embriones procedentes de 762 ciclos de ICSI, realizados tanto con ovocitos propios (n=110) como con ovocitos de donante (n=652). Los criterios de exclusión fueron: ciclos en los que se realizó biopsia testicular, los que se planificó cultivo hasta el estadio

de blastocisto y en los que hubo transferencia embrionaria en día 2. Las pacientes fueron asignadas de forma aleatoria al grupo de estudio (n=382) y al grupo control (n=380) justo antes de realizar ICSI. Los embriones asignados al grupo control fueron evaluados en día 2 y día 3 de desarrollo, mientras que los embriones asignados al grupo de estudio solamente se evaluaron en día 3 de desarrollo, clasificando los embriones de acuerdo a un sistema de valoración estandarizado (de 1 a 10 y de A a D). Los embriones de mejor calidad en cada ciclo se seleccionaron para ser transferidos en fresco en día 3 en todos los casos. El tamaño de la muestra del estudio fue calculado para detectar una diferencia del 10% en la tasa de embarazo bioquímico. Los datos se analizaron mediante regresión logística ajustando por tipo de técnica (ovocitos propios o recepción de ovocitos), edad de la paciente o donante, IMC de la paciente o receptora de los ovocitos, origen del semen (pareja o donante) y estado del semen (fresco o congelado).

RESULTADOS:

En el 93% de los casos se realizó transferencia de 2 embriones. No se observaron diferencias significativas en las tasas de embarazo bioquímico

(43.2% vs. 46.3%), clínico (28.5% vs. 31.3%) y evolutivo (24% vs. 30.8%) entre el grupo de estudio y control. Según los resultados de este estudio, la procedencia de los ovocitos per se (propios o de donante) no afecta a la tasa de embarazo (p=0.72), siendo la edad de la paciente o donante (de media 36.8 y 26.5 años, respectivamente) el único factor que afecta a las tasas de embarazo clínico y evolutivo (p=0.019).

CONCLUSIONES:

No se encontraron diferencias significativas en las tasas de embarazo entre embriones valorados morfológicamente en día 2 y en día 3 de desarrollo, en comparación con aquellos que sólo se evaluaron en día 3. Nuestros resultados indican que el beneficio que aporta tener un mayor conocimiento del tiempo de división debido a la valoración en día 2 de los embriones podría quedar anulado por el efecto negativo de alterar las condiciones de cultivo. Recomendamos entonces no realizar la valoración de los embriones en día 2 de forma rutinaria.

P-063 DESARROLLO MORFOCINÉTICO DE LOS PRE-EMBRIONES PARTENOGENÉTICOS HAPLOIDES HUMANOS

L. Escrich Albelda, N. Grau Grau, Y. Galiana Briones, A. Galan Rivas, A. Delgado Mendibe, MJ. Escribá Pérez
 IVI-Valencia, Valencia
laura.escrich@ivi.es

INTRODUCCIÓN:

La activación oocitaria artificial ha ocupado un espacio tecnológico en los laboratorios de FIV como técnica coadyuvante de los ICSIs de mal pronóstico así como técnica de validación de los protocolos de maduración in vitro. Sin embargo, poco se conoce acerca de su competencia en la inducción del desarrollo partenogenético en humanos.

OBJETIVOS:

Describir el desarrollo temprano de los partenogenotas haploides humanos y compararlos con aquéllos bipronucleares, correctamente fecundados (control).

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se comparó la morfocinética del desarrollo embrionario temprano hasta estadio de 8 células de 8 partenogenotas uniparentales con 20 pre-embriónes correctamente fecundados (control).

Los partenogenotas se generaron mediante un protocolo de activación oocitaria artificial (AOA), basado en una incubación seriada en ionóforo de calcio (A23187; 8mM; 5 minutos) y puromicina (10µM; 5hrs). Tras la AOA, los partenogenotas fueron cultivados en un incubador con sistema time-lapse durante 3 días.

Por su parte, 20 pre-embriónes bipronucleares (control) fueron retrospectivamente seleccionados por resultar, tras su transferencia intraútero en día 3 de desarrollo, en nacidos vivos sanos.

Tras el escrutinio de las filmaciones del desarrollo embrionario de

partenogenotas y controles, se obtuvieron los tiempos de división desde el estadio de 2 a 8 células (variables directas); datos que nos permitieron determinar la duración del segundo (cc2) y tercer (cc3) ciclo celular (variables indirectas).

RESULTADOS:

Los pre-embriónes partenogenotas se dividen significativamente más tarde que aquéllos control en todas las siete primeras divisiones (tabla). Además, los partenogenotas mostraron un cc2 significativamente más largo que los controles (15.0±1.9hrs vs. 11.8±1.2hrs); sin embargo, entre ambos especímenes pre-embriónarios, no se observaron diferencias significativas en la duración del cc3 (18.0±3.1hrs (95CI:16.7-19.4hrs)).

CONCLUSIONES:

Nuestros resultados muestran un desarrollo morfocinético diferencial en los partenogenotas respecto a los controles; en particular, parece que la correcta evolución cinética desde el estadio de 2 a 4 células es dependiente de la presencia del espermatozoide, mientras que el desarrollo ulterior (desde el estadio de 4 a 8 células) pudiera ser oocito-dependiente.

	Embriones Control (n=20)	
Tiempo de división al estadio de (hrs.):		
2-cel. (t2)	30.6±3.5 (26.3-34.9)b	25.4±2.8 (24.1-26.7)a
3-cel. (t3)	44.9±4.5 (39.3-50.5)b	37.0±3.6 (35.3-38.7)a
4-cel. (t4)	46.3±3.7 (41.7-50.8)b	37.5±3.7 (35.7-39.2)a
5-cel. (t5)	62.8±6.0 (55.4-70.2)b	53.1±5.8 (50.4-55.8)a
6-cel. (t6)	63.9±5.5 (57.0-70.8)b	54.1±5.9 (51.3-56.8)a
7-cel. (t7)	67.3±7.5 (58.0-76.7)b	55.3±5.9 (52.6-58.1)a
8-cel. (t8)	70.9±8.6 (49.5-92.4)b	58.1±6.4 (55.1-61.2)a

a,b diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

P-064 USO DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO PARA LA DETERMINACIÓN DE ANEUPLOIDÍAS EN ESPERMATOZOIDES: PUESTA A PUNTO Y VALIDACIÓN

I. Gutiérrez Díaz, S. Pardal Gil, N. Molinero García, M. Mata Campuzano, F. Martínez Pastor
 Universidad de León, León
felipe.martinez@unileon.es

INTRODUCCIÓN:

Entre el 10 y 15% de las parejas en edad reproductiva se enfrentan a problemas de infertilidad (1). Una de las causas es la presencia de anomalías cromosómicas en los espermatozoides, debido a una segregación anómala de los cromosomas durante la meiosis. Estas alteraciones pueden causar infertilidad o embarazos no viables. En embarazos viables, las aneuploidías causan problemas importantes en la descendencia. Disponer de una técnica rápida y de bajo coste para detectar la incidencia de aneuploidías en una muestra de semen sería un gran avance diagnóstico.

OBJETIVOS:

1. Comparar dos técnicas de análisis de aneuploidías en semen humano, para evaluar cuál es la más adecuada.
2. Determinar la relación de los análisis de aneuploidías con evaluaciones mediante FISH.

MATERIAL Y MÉTODOS:

El análisis de aneuploidías mediante citometría de flujo se realizó en 13

muestras de semen según Lazaros et al. (2) y Antonucci et al. (3). El protocolo de Lazaros et al. fija las muestras en etanol 70% durante 2 h a -20 °C. Tras eliminar el etanol, se añade 1 mL de solución de tinción (PBS 0,1% Triton X-100, 40 µg/mL de yoduro de propidio, 0,1 mg/mL RNase-DNase free), incubando 30 min en oscuridad. Antonucci et al. fijan con PBS 0.5% formaldehído (10 min a 4 °C). Tras lavar, se incubaba 30 min con 600 µl de solución de descondensación (PBS 0,1% Triton X-100, 5 mM DTT, 100 U/mL heparina), tiñendo como Lazaros et al. Otras 19 muestras, evaluadas para FISH (cromosomas 22, X e Y), se analizaron según Antonucci et al. y para fragmentación de ADN y madurez de la cromatina según Evenson (4). Los análisis se realizaron con un citómetro FACScalibur (10.000 espermatozoides/muestra).

RESULTADOS:

Los resultados de ambas técnicas fueron similares (Tabla 1). Se obtuvieron histogramas de fluorescencia, con un pico correspondiente a eventos haploides (Fig. 1). La distribución a la izquierda del pico (menor fluorescencia) corresponde a eventos hipohaploides, mientras que a la

derecha corresponde a espermatozoides inmaduros, hiperhaploides y eventos 2n y >2n, sucesivamente. En la técnica de Antonucci et al. se obtuvo un pico mejor definido. En la comparación con FISH, se determinó que 7 muestras de 19 tenían histograma alterado. Dos tenían FISH alterado. La inmadurez por SCSA correlacionó con la técnica (r=0,48; P=0,014), pero no la fragmentación del ADN (9 alta, 5 moderada).

CONCLUSIONES:

La técnica de Antonucci et al. parece ser más precisa, obteniéndose poblaciones y picos más definidos. La comparación con FISH muestra que la técnica es suficientemente sensible para detectar desequilibrios cromosómicos. A falta de análisis citogenéticos específicos, nuestra hipótesis es que FISH (dirigido a pocos cromosomas) no detectaría algunas alteraciones, que en nuestro estudio resultaron en histogramas anormales. La detección de aneuploidías mediante citometría de flujo (rápida y barata) podría ser útil para descartar muestras sin alteraciones citogenéticas, derivando los positivos a un estudio FISH específico.

Tabla 1. Proporción de células encontrada en cada una de las regiones en las que se dividió el histograma de la fluorescencia del IP.

Técnica	Hipohaploides	Haploides	Inmaduros	Hiperhaploides	Diploides	>2n
Antonucci et al.	6±1,3	69±5,2	7,9±0,9	8,1±1,7	2,8±1	0,8±0,3
Lazaros et al.	6,1±1,5	69,1±3,5	9,7±1	10,4±1,2	3,2±0,6	0,9±0,3

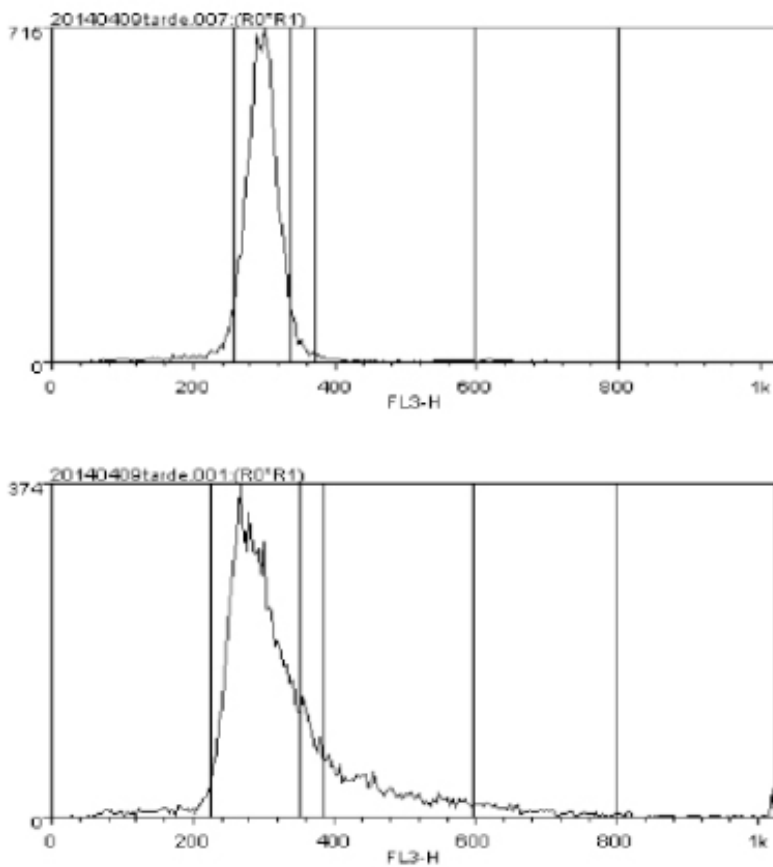


Fig. 1. Histogramas de una muestra estándar. Arriba: según Antonucci et al.; abajo: según Lazaros et al.

BIBLIOGRAFÍA:

1. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010.

2. Lazaros LA, Vartholomatos GA, Hatzi EG, Kaponis AI, Makrydimas GV, Kalantaridou SN, et al. Assessment of sperm chromatin

condensation and ploidy status using flow cytometry correlates to fertilization, embryo quality and pregnancy following in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet.* 2011, 28:885-91.

3. Antonucci N, Manes S, Corradetti B, Manicardi GC, Borini A, Bizzaro D. A novel in vitro sperm head decondensation

protocol for rapid flow cytometric measurement of deoxyribonucleic acid content. *Fertil Steril.* 2013, 99:1857-61.

4. Evenson DP. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®). *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2013, 927:147-64.

P-065 EFECTOS DIFERENCIALES EN LA CINÉTICA DE DIVISIÓN DE EMBRIONES OBTENIDOS A PARTIR DE ESPERMATOZOIDES CON ROTURAS DE CADENA SENCILLA O DOBLE DEL ADN SUGIEREN LA ACTIVACIÓN DE UN MECANISMO DE CONTROL EN RESPUESTA AL DAÑO DE DOBLE CADENA

A. Casanovas Fontanillas (1), J. Ribas Maynou (2), S. Novo Bruna (1), J. Benet Català (3), J. Carrera Rotllan (1), A. García Peiró (2) (1) Unitat Endocrinologia Ginecològica, Vic, Barcelona, (2) Centro de Infertilidad Masculina y Análisis de Barcelona, (3) Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Universitat Autònoma de Barcelona.
acasanovas@ueg-reproduccion.com

INTRODUCCIÓN:

Estudios previos en modelos animales han demostrado que la fragmentación de doble cadena del ADN espermático (dsSDF) induce la activación de mecanismos de control del ciclo celular y apoptosis. La contribución genética de un espermatozoide que contenga dsSDF podría tener efectos similares en el desarrollo embrionario humano. Por otra parte, el desarrollo de sistemas de monitorización embrionaria mediante time-lapse permite una mayor precisión en la caracterización de las etapas del desarrollo embrionario preimplantacional. Su aplicación tanto en investigación como en el manejo de la infertilidad se están dirigiendo al desarrollo de estrategias que permitan decidir aquellos embriones con mayores probabilidades de implantación tras ser transferidos al útero materno.

OBJETIVOS:

El principal objetivo de este estudio ha sido determinar el efecto de las roturas de cadena sencilla y doble del ADN espermático en la morfocinética embrionaria determinada mediante tecnología time-lapse en ciclos de reproducción asistida mediante ICSI.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Los datos se han obtenido de forma prospectiva en 32 ciclos de ICSI: 14 con edad materna menor o igual a 34 y 18 con edad materna mayor de 34. Se han estudiado un total de 159 embriones que fueron monitorizados mediante la tecnología time-lapse (Primo-vision, Vitrolife, Sweden). La valoración de las roturas de cadena sencilla y doble del ADN espermático se realizó mediante el método COMET alcalino y neutro, respectivamente, en la misma muestra de semen que se utilizó para realizar la ICSI.

RESULTADOS:

En ninguna de las etapas de desarrollo analizadas se observó efecto alguno de la fragmentación de cadena sencilla del ADN espermático en la cinética embrionaria ($p > 0,05$). Los embriones generados a partir de muestras de semen con fragmentación de cadena doble elevada presentaron una cinética embrionaria más lenta que aquellos embriones procedentes de pacientes con valores normales de fragmentación de doble cadena. El efecto fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en las siguientes etapas: extrusión 2°

corpúsculo polar (48 min. más lento); desaparición de pronúcleos (1h 41 min.); inicio 2 células (1h 55 min.); 2 células (2h 10 min.); 3 células (2h 24 min.); 4 células (1h 55min); 5 células (2h 24min); 6 células (2h 38min); blastocito (5h 46min).

Por otra parte, no se observó ninguna implantación en embriones obtenidos a partir de eyaculados con valores anómalos de espermatozoides con roturas de doble cadena (>60%) y una edad materna mayor de 34 años sugiriendo una relación entre reparación de la fragmentación de doble cadena del ADN espermático y la edad materna.

CONCLUSIONES:

Los resultados preliminares obtenidos muestran que la fragmentación de cadena doble del ADN espermático tiene un efecto de retraso sobre la cinética embrionaria, mientras que este tipo de efecto no se observa asociado a la fragmentación de cadena sencilla. Además, la fragmentación de cadena doble del ADN espermático en relación con la edad materna se asocia a la capacidad de implantación del embrión.

P-066 DIAGNÓSTICO DEL COMPLEJO DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN EMBRIONES PREIMPLANTACIONALES MEDIANTE KARYOMAPPING

C. Giménez Sevilla (1), M. Konstantinidis (2), M. Sandalinas Alabert (1), R. Prates (2), S. Jaroudi (2), N. Goodall (2), E. Garcia Guixé (1), C. Arjona Fernández (1), S. Munné (2), D. Wells (3)

(1) Reprogenetics Spain, Barcelona, (2) Reprogenetics, (3) Reprogenetics UK
litus@reprogenetics.es

INTRODUCCIÓN:

El DGP convencional para casos de HLA matching se lleva a cabo mediante metodologías de PCR que amplifican diferentes regiones polimórficas (STRs) dentro de y colindantes al complejo de histocompatibilidad mayor (CHM). Esta estrategia requiere a menudo de un desarrollo y validación específico para cada pareja, lo que supone unos pocos meses para completarse. El desarrollo y disponibilidad de un método universal sería muy beneficioso para los pacientes tanto porque permitiría realizar el tratamiento antes como, y sobre todo, porque permitiría el trasplante a la persona enferma en menor tiempo.

OBJETIVOS:

Evaluar la utilidad de la técnica del Karyomapping (Handyside et al., 2010; Natesan et al., 2014) en casos de tipaje de HLA.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se utilizó la PCR convencional y arrays de SNPs para la preparación de casos de tipaje de HLA. Se realizaron un total de 16 ciclos de DGP para tipaje de HLA o HLA y enfermedad monogénica (SGD) mediante uno u otro sistema y se analizaron un total de 106 embriones (66 en d3 y 40 blastocistos). En ocho ciclos (biopsia en d3 y transferencia en

fresco) se utilizó un método estándar de PCR que incluye 19 STRs. Mediante arrays de SNPs y análisis de 524 SNPs por Karyomapping (Illumina, USA) se valoraron embriones en d5 procedentes de ocho ciclos (transferencia diferida). Además, se realizó análisis de todos los cromosomas en 5 de los 8 ciclos en diferido.

RESULTADOS:

El tiempo medio requerido para el desarrollo de un protocolo mediante PCR (en días \pm error estándar de la media) fue de 78 ± 11 para casos de HLA y de $180,25 \pm 13,1$ para HLA+SGD, el tiempo medio combinado fue de $146,2 \pm 23,3$. Mediante Karyomapping, el tiempo requerido para un caso de HLA fue de $41,4 \pm 10,7$ días y de $34,5 \pm 7,3$ para HLA+SGD. El tiempo medio de preparación combinado resultó en $37,6 \pm 6,3$, significativamente inferior ($p < 0,001$) al necesario mediante PCR.

En total, 6/57 embriones en d3 y 6/36 blastocistos fueron HLA compatibles, no afectos/portadores y euploides (en los casos en que se analizó la ploidía). Se realizó transferencia en 8 de los 16 ciclos realizados. El seguimiento de 4 de estos ciclos en los que hubo transferencia, muestra dos embarazos evolutivos y el nacimiento de un bebé sano que resultó en un trasplante.

CONCLUSIONES:

A pesar de disponer de un método de PCR ampliamente probado y con buenos resultados, la utilización del Karyomapping permite una elevada reducción del tiempo necesario para la preparación del test al mismo tiempo que una mayor cobertura de la región de interés.

BIBLIOGRAFÍA:

Handyside, A.H., Harton, G.L., Mariani, B., Thornhill, A.R., Affara, N., Shaw, M-A., Griffin, D.K., 2010. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *J. Med. Genet.* 47:651-658.

Natesan, S.A., Bladon, A.J., Coskun, S., Qubbaj, W., Prates, R., Munne, S., Coonen, E., Dreesen, J.C., Stevens, S.J., Paulussen, A.D., Stock-Myer, S.E., Wilton, L.J., Jaroudi, S., Wells, D., Brown, A.P., Handyside, A.H., 2014. Genome-wide karyomapping accurately identifies the inheritance of single-gene defects in human preimplantation embryos in vitro. *Genet. Med.* 16(11):838-845.

P-067 DETERMINACIÓN DE PUENTES DISULFURO EN LA CROMATINA ESPERMÁTICA Y RELACIÓN CON LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN Y MADUREZ DE LA CROMATINA POR SCSA

V. Justel Castaño, S. Pardal Gil, E. Fernández Alegre, M. Mata Campuzano, F. Martínez Pastor
Universidad de León, León
felipe.martinez@unileon.es

INTRODUCCIÓN:

La estructura de la cromatina espermática es de gran importancia para la fertilidad masculina. Ésta puede informar sobre trastornos como varicocele, estrés oxidativo, cáncer testicular y otras alteraciones. Estas alteraciones pueden afectar muy negativamente tanto a la fertilidad natural como las técnicas de reproducción asistida. La formación de puentes disulfuro entre protaminas es un paso crucial para la compactación del núcleo espermático, y por tanto relacionado con la estructura general de la cromatina. Algunos autores han utilizado el reactivo monobromobimano (mBBBr) para detectar sulfhidrilos libres (SH), relacionándolos con alteraciones como oligoastenozoospermia (1) o con cáncer testicular (2).

OBJETIVOS:

Relacionar los resultados de la técnica SCSA (3), fragmentación del ADN espermático y madurez de la cromatina, con los resultados de la técnica del mBBBr para detectar sulfhidrilos libres en la cabeza espermática.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Los análisis se realizaron en 10 muestras de semen eyaculado. Las muestras se diluyeron en TNE a 2×10^6 mill./mL y se mantuvieron a -80 °C. Tras descongelarse, cada muestra se dividió en 2, y una de las alícuotas se incubó a 37 °C 10 min con 50 μ M de DTT para reducir los puentes disulfuro. Los

dos tubos se lavaron, y tiñeron con mBBBr ($0,5$ mmol/L). Tras 10 min a 37 °C, se eliminó el sobrenadante por centrifugación y se añadieron 500 μ L de PBS. Antes de analizar, las muestras se sonicaron para aislar las cabezas. La fragmentación de ADN (fragmentación elevada total y muy elevada) y madurez de la cromatina se analizaron según Evenson (3). Los análisis se realizaron con un citómetro CyAn ADP (5.000 espermatozoides/muestra). Para evaluar SH, se obtuvo la relación entre las media de la fluorescencia del mBBBr en los tubos sin tratar y los tratados con DTT. En los tubos sin tratar se determinó la proporción de espermatozoides con fluorescencia baja (pocos SH), media y alta (muchos SH).

RESULTADOS:

La fragmentación del ADN fue del $22,3\% \pm 2,6$ [$10,6-35,3$], con un $7,8\% \pm 1,4$ [$2,0-14,1$] de espermatozoides con fragmentación muy alta. La madurez fue del $6,6\% \pm 0,9$ [$3,4-11,1$]. La proporción de SH fue del $27,6\% \pm 4,4$, con un amplio rango [$11,3-47,4$]. De media, la mitad de los espermatozoides tuvieron fluorescencia baja ($50,6\% \pm 6,9$), seguido por fluorescencia media ($41,6\% \pm 5,2$), siendo minoritarios los del grupo de alta ($7,8\% \pm 2,1$). No se encontraron correlaciones significativas (Pearson) entre las variables obtenidas del análisis con mBBBr y la fragmentación elevada total (%DFI) o la compactación/madurez de la cromatina (%HDS). La fragmentación elevada (h-%DFI) tampoco se relacionó significativamente con la proporción de

SH, pero correlacionó negativamente con la proporción de espermatozoides con fluorescencia alta ($r=-0,70$; $P=0.023$).

CONCLUSIONES:

Los resultados sugieren que la técnica SCSA y la del mBBBr informan de características distintas de la cromatina espermática, siendo posiblemente complementarias. Hemos observado que las muestras con mayor proporción de espermatozoides con fragmentación considerada muy alta están asociadas a una menor proporción de la población con alta fluorescencia de mBBBr. Esta podría ser una consecuencia de un mayor estrés oxidativo, causando graves daños al ADN a la vez que altera el estado redox de los sulfhidrilos de las protaminas.

BIBLIOGRAFÍA:

1. De Mateo S, Ramos L, van der Vlag J, de Boer P, Oliva R. Improvement in chromatin maturity of human spermatozoa selected through density gradient centrifugation. *Int J Androl*. 2011 Jun; 34(3):256-67.
2. O'Flaherty C, Vaisheva F, Hales BF, Chan P, Robaire B. Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2008 May; 23(5):1044-52.
3. Evenson DP. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®). *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2013; 927:147-64.

P-068 RESULTADOS DE LA TRANSFERENCIA ELECTIVA DE UN EMBRIÓN (ESET) EN CICLOS DE DONACIÓN DE ÓVULOS

J. Cuadros Fernández, L. Andrés Criado, M. Morales Morales, E. Ricciarelli
Clínica FIVMadrid, Madrid
jcuadros@fivmadrid.es

INTRODUCCIÓN:

Ante la necesidad de reducir la elevada tasa de embarazo gemelar que se da en las pacientes sometidas a donación de oocitos, crece la tendencia de proponer la transferencia electiva de un embrión, ya que se mantienen las tasas de embarazo en ciclos con buen pronóstico. Además, son ciclos en los que hay al menos un embrión más de buena calidad para congelar, lo que hace que la tasa de embarazo acumulada con la descongelación, aumente; o que las pacientes tengan la posibilidad de un embarazo posterior sin hacer un nuevo ciclo de donación de oocitos.

OBJETIVOS:

Comparar los resultados obtenidos en los ciclos de donación de oocitos cuando decidimos transferir un solo embrión (grupo eSET) con los obtenidos transfiriendo de manera electiva dos embriones (grupo eDET).

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo de 85 ciclos con transferencia y resultado en receptoras de oocitos en las que se realizó la transferencia electiva de un embrión, comparados con 115 ciclos con transferencia electiva de dos embriones. Analizamos las tasas de embarazo clínico, aborto, embarazo múltiple y embarazo acumulado con la descongelación, en nuestras pacientes del programa de donación de oocitos.

RESULTADOS:

La tasa de embarazo clínico fue del 48,2% (41/85) en el grupo de eSET y del 59,1% (68/115) en el grupo de eDET. La tasa de aborto fue del 26,8% (11/41) en el grupo de eSET y del 19,1% (13/68) en el grupo de eDET. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas. No hubo embarazos múltiples en el grupo de eSET, mientras que en el grupo de eDET la tasa fue del 23,5% ($p < 0,001$).

La tasa acumulada de embarazo clínico con la descongelación es del 73% en ambos grupos.

CONCLUSIONES:

A pesar de que la tasa de embarazo clínico es aparentemente más baja en el grupo de eSET, el hecho de que no haya diferencias estadísticamente significativas apoya nuestra propuesta de transferir un único embrión en pacientes receptoras de oocitos, para evitar la elevada tasa de embarazos gemelares que obtenemos transfiriendo dos embriones. Además, la tasa acumulada de embarazo clínico con la descongelación embrionaria iguala la probabilidad de gestación en ambos grupos.

P-069 ANÁLISIS CROMOSÓMICO MEDIANTE ARRAYS DE CGH DE EMBRIONES PROCEDENTES DE CIGOTOS MONOPRONUCLEARES POST-ICSI

S. Mateo Cuadros (1), F. Vidal Domínguez (2), V. Montalvo Pallès (1), M. Parriego Beltrán (1), I. Rodríguez García (1), A. Veiga Lluch (1), M. Boada Palà (1)
(1) Hospital Universitario Quirón Dexeus, Barcelona (2) Unidad Biología Celular, Facultad de Biociencias, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra
silmat@dexeus.com

INTRODUCCIÓN:

La introducción de nuevas metodologías, como la monitorización dinámica o los arrays de CGH, se aplican en el proceso de selección embrionaria para intentar mejorar los resultados de los ciclos de

FIV/ICSI. Los embriones que provienen de cigotos con un único pronúcleo (1PN) tras ICSI se suelen descartar para su utilización clínica ya que estudios recientes han demostrado que estos embriones suelen presentar un elevado número de células aneuploides. En la

mayoría de situaciones, estas anomalías comprometerán la viabilidad del embrión, aunque un cierto porcentaje de estos cigotos puede alcanzar el estadio de blastocisto y estos podrían tener una constitución cromosómica normal.

OBJETIVOS:

El objetivo de este trabajo es estudiar retrospectivamente los resultados del análisis de embriones provenientes de cigotos monopronucleares tras ICSI en ciclos de DGP por cribado de aneuploidías (PGS; 24 cromosomas) para determinar su constitución cromosómica y su posible uso con fines reproductivos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se han estudiado 89 embriones procedentes de cigotos 1PN obtenidos en 64 ciclos de PGS, cultivados en un sistema time-lapse (Embryoscope™), biopsia de un único blastómero en D+3 y cribado de aneuploidías mediante arrays de CGH. La amplificación del ADN y el análisis cromosómico se realizaron mediante 24 sure kit®, Fluorescent labeling systemy, BlueFuse Multi (Illumina®). Se analizó la dotación cromosómica de los embriones, el desarrollo embrionario hasta D+5, la tasa de blastocisto y la relación entre desarrollo y estatus cromosómico.

RESULTADOS:

El estudio cromosómico reveló que el 16,9% (15/89) de los embriones

eran cromosómicamente normales y el 60,7% (54/89) anormales, siendo un 46,3% (25/54) aneuploidías simples (1-2 cromosomas alterados) y un 53,7% (29/54) aneuploidías complejas (≥ 3 cromosomas alterados). El resto de embriones (22,4%; 20/89) no presentó un diagnóstico concluyente (SD) debido a la falta de amplificación (13,4%; 12/89) o a la observación de un perfil de diagnóstico errático que no permitió un diagnóstico fiable para algún cromosoma (9%; 8/89).

La valoración del desarrollo embrionario demostró que el 3,4% (3/89) de los embriones alcanzó el estadio de blastocisto. Del resto, un 36% (32/89) se bloqueó en estadio de mórula y el 60,6% (54/89) se bloqueó en D+3 o degeneró.

La relación entre evolución embrionaria y dotación cromosómica puso de manifiesto que los embriones normales alcanzaron el estadio de blastocisto en un 13,3% (2/15), mientras que ninguno de los caracterizados como anormales alcanzó este estadio (0/54). De los embriones anormales, un 70,4% bloquearon su desarrollo en D+3 (38/54) y un 29,6% en estadio de mórula (16/54). De los embriones SD un 5% alcanzó el estadio de blastocisto

(1/20). De los embriones SD por no amplificación el 83,3% se bloqueó en D+3 (10/12).

CONCLUSIONES:

La baja tasa de embriones derivados de cigotos 1PN de ICSI que tras biopsia en D+3 consiguen formar un blastocisto, aconseja realizar únicamente el análisis genético de estos embriones si alcanzan el estadio de blastocisto para poder así optimizar el coste-beneficio del estudio cromosómico.

Los embriones procedentes de cigotos monopronucleares post-ICSI pueden presentar una dotación cromosómica normal y alcanzar el estadio de blastocisto, por lo que se podría plantear su cultivo hasta blastocisto y su utilización para transferencia o congelación en caso de alcanzar ese estadio y confirmarse su normalidad cromosómica mediante PGS.

P-070 FACTORES PRONÓSTICO DE LA REDUCCIÓN EMBRIONARIA ESPONTÁNEA (EVANESCENCIA EMBRIONARIA) EN LAS GESTACIONES MÚLTIPLES DE CICLOS DE FIV/ICSI

R. Mendoza Hourtouat, A. Expósito Navarro, MV. Aparicio Prieto, M. Iglesias Calabria, R. Matorras Weinig
Hospital Universitario Cruces, Baracaldo, Bizkaia
m.rosariomendozahourtouat@osakidetza.net

INTRODUCCIÓN:

La reducción embrionaria espontánea o "embrión evanescente" es un fenómeno que ocurre a veces, muy temprano en el embarazo múltiple cuando uno de los fetos "desaparece." Cuando se pierde un feto en el primer trimestre, el feto o los fetos restantes generalmente continúan desarrollándose normalmente, aunque puede ocurrir sangrado vaginal.

OBJETIVOS:

Identificar si existe algún parámetro del ciclo FIV/ICSI o de las características de las pacientes que esté relacionado con la reducción embrionaria espontánea (embrión evanescente) en los embarazos múltiples conseguidos en ciclos de FIV/ICSI.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio cohorte retrospectivo en el que se estudian los embarazos múltiples evolutivos (gemelares y triples) obtenidos por FIV/ICSI entre 1994-2013 (N=558; 460 gemelares y 98 triples). La gestación múltiple fue diagnosticada mediante ecografía 6-7 semanas después de la transferencia embrionaria. Las características de

las pacientes (edad, índice de masa corporal (IMC), tipo y duración de la esterilidad, etiología de la esterilidad) y los parámetros del ciclo: técnica (FIV o ICSI/MIXTA), protocolo de estimulación, número de intento, valor de estradiol el día de la administración de hCG, número medio de ovocitos obtenidos e inseminados, número medio y calidad de los embriones transferidos, duración de la transferencia embrionaria y niveles de hCG 14-16 días después de la misma, se estudiaron en aquellas pacientes que habían sufrido la reducción espontánea de algún embrión (RE) y se compararon con los que terminaron sin reducción.

RESULTADOS:

La reducción espontánea (RE) se observó en el 27.0% de los embarazos múltiples estudiados (N=558): 22.2% en los gemelares y 49.0% de los

triples. Al comparar las reducciones espontáneas con las no reducciones, se observó una mayor edad materna en los embarazos triples reducidos (34.7 ± 2.5) frente a los no reducidos (32.9 ± 2.7), $p=0.001$. El resto de los parámetros estudiados fueron semejantes tanto en los embarazos gemelares, como en los triples y la población total (gemelares más triples).

CONCLUSIONES:

El único parámetro pronóstico de la reducción embrionaria espontánea en las gestaciones conseguidas en ciclos de FIV/ICSI es la mayor edad en las pacientes con embarazo triple.

BIBLIOGRAFÍA:

- Predictors of spontaneous reduction in multiple pregnancies conceived following

assisted reproductive technology. Yavuz Emre Sukur, Tugba Altun, Lubna Pal. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2012,162:174-177.

- The vanishing twin: a review. Landy HJ and Keith LG. *Human Reproduction Update* 1998,4:177-183.

- Clinical and morphological aspects of the vanishing twin phenomenon. Jauniaux E, Elkazen N, Leroy F, Wilkin P, Rodesch F, Hustin J. *Obstet Gynecol* 1988,72:577-81.

- Spontaneous embryonic loss following in vitro fertilization: Incidence and effect on outcomes. La Sala GB, Nucera G, Gallinelli A, Nicoli A, Villani MT and Blickstein I. *Am J Obstet Gynecol* 2004, 191:741.

P-071 ¿CUÁNDO BIOPSIAR LOS EMBRIONES EN CASOS DE DGP, EN DÍA 3 O EN BLASTOCISTO?

N. Almunia Santiago, I. Torres González, AM. Villaquirá Villalba, JC. García Torón, E. Gómez Sánchez
Tahe Fertilidad, Murcia
nuria.almunia@tahefertilidad.es

INTRODUCCIÓN:

El diagnóstico genético preimplantacional (PGS) incrementa las posibilidades de obtener un embarazo viable, libre de aneuploidías y de enfermedades monogénicas. En los últimos años se ha propuesto que la biopsia del trofoblasto de blastocistos ayudaría a incrementar los resultados del PGS ya que permitiría el estudio de más células, se realizaría en un momento en el que el embrión está más desarrollado, por lo que le perjudicaría menos, y solo se analizarían los embriones que realmente tuvieran capacidad de desarrollo. En la actualidad la mayoría de los centros de reproducción llevan a cabo este procedimiento en día 3 de cultivo pero existe una tendencia a un cambio gradual a día 5.

OBJETIVOS:

Evaluar y comparar los resultados de diagnóstico e implantación entre pacientes a los que se les realizó la biopsia de embriones en día 3 o 5 de cultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se analizaron los resultados de DGP de 18 pacientes. Se realizaron 20 ciclos, en 11 de ellos los embriones fueron biopsiados en día 3 y en 9 en día 5. En todos los casos de día 5 los embriones fueron vitrificados mediante la técnica de Cryotop por no poder tener los resultados a tiempo para la transferencia en fresco. La biopsia fue realizada con un láser Zilos-tk (Hamilton Thorne). Los medios de cultivo utilizados fueron secuenciales de Vitrolife. Los grupos de pacientes fueron homogéneos en

cuanto a edad, tipo de ciclo y calidad seminal.

RESULTADOS:

Se biopsiaron 50 embriones en día 3, el 70.4% de los ovocitos fecundados, y 44 en día 5, el 44% de los fecundados. El número de embriones diploides fue de 14 (28%) en día 3 y de 17 (38,6%) en día 5.

Los embriones no informativos en día 3 fueron 3 (6%) y 5 (11,4 %) en día 5. El número de ciclos con todos los embriones alterados fue de 4 (44,4 %) en día 3 y de 1 (11,1 %) en día 5.

En el grupo de biopsia en día 3 se realizaron 7 transferencias con 2 embarazos (28,6%), tasa de implantación del 33,3% y ningún aborto, por lo que el porcentaje de embarazo en

curso fue del 28,6%. En los pacientes en los que la biopsia se realizó en día 5, se llevaron a cabo 8 transferencias de embriones desvitrificados, con el resultado de 6 embarazos (75%), tasa de implantación del 53,9% y 2 abortos (33,3%), el porcentaje de embarazo en curso fue del 44,4%.

CONCLUSIONES:

Aunque los resultados obtenidos no son significativos debido al bajo número de ciclos incluidos en el estudio, la tendencia de los resultados nos indicaría que biopsiando blastocistos, en vez de embriones de día 3, se obtiene

un mayor porcentaje de embriones diploides y una mayor tasa de gestación. Estos resultados son completamente comparables a los publicados en la literatura.

P-072 ¿DISMINUYE LA VARIABILIDAD ENTRE CENTROS, EN LA CLASIFICACIÓN DE ASEBIR, EL USO DE SISTEMAS DE MORFOCINÉTICA EMBRIONARIA?

L Martínez Granados (1), A González Utor (2), M Serrano Molina (3), V Badajoz Liébana (4), N Prados Dodd (5), E Olaya Vila (6), A Farreras Ayestaran (7), S Zamora López (8), M López Regalado (1), N Ortiz Piñate (9), JA. Castilla Alcalá (1)

(1) Unidad de Reproducción UGC Laboratorio Clínico y UGC Obstetricia y Ginecología. Complejo Hospitalario Universitario de Granada. Instituto de Investigación Biosanitario de Granada (IIBG), Granada, España., (2) MasVida Reproducción, Grupo de Interés de Calidad de ASEBIR, Sevilla, España., (3) Clínica IFEM, Córdoba, España., (4) Ginefiv, Madrid, España., (5) IVI, Sevilla, España., (6) Clínica Tambre, Madrid, España., (7) Institut Marqués, Barcelona, España., (8) CEIFER, Granada, España., (9) Instituto Europeo de Fertilidad, Grupo de Interés de Calidad de ASEBIR, Madrid, España.

luis margra@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

Los criterios de ASEBIR para la clasificación embrionaria han echado raíces en los laboratorios de embriología nacionales. Recientemente se ha incorporado en estos laboratorios las plataformas de morfocinética, aplicando los criterios de clasificación ASEBIR a los vídeos tomados por estos sistemas. Es conocida la variabilidad entre centros a la hora de la clasificación embrionaria, para lo cual ASEBIR dispone de un programa de control de calidad externo desde hace varios años. Se desconoce el impacto que los sistemas de morfocinética tienen en la variabilidad entre centros en la aplicación de los criterios de ASEBIR de clasificación embrionaria.

OBJETIVOS:

Determinar la influencia de los sistemas de morfocinética en la concordancia entre centros al utilizar los criterios de ASEBIR de clasificación embrionaria.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se comparan los resultados obtenidos en clasificación embrionaria siguiendo

criterios ASEBIR del programa de control de calidad externo de ASEBIR de laboratorio de embriología (2011-2014) y los obtenidos en el ensayo piloto de control calidad externo de morfocinética realizado por ASEBIR (2014). En el primero se analizaron en día+2 30 vídeos de embriones, día+3 30 vídeos de embriones y día+5 20 vídeos de embriones, a partir de los cuales los centros deben clasificar los embriones. Todos los videos tenían una duración de 20-30 segundos, por lo que se denominó a este grupo como "Clasificación de ASEBIR según criterios clásicos (estáticos)". Y en el ensayo piloto de control de calidad externo se enviaron a los centros participantes videos tomados cada 5-20 minutos de 31 embriones a los usuarios de Embryoscope y 35 embriones a los de Primo Vision, debiendo, en base a estos vídeos clasificar los embriones. A este grupo se denominó ¿Clasificación de ASEBIR según morfocinética? Para valorar el grado de acuerdo entre observadores se calculó el porcentaje de acuerdo ponderado y la Kappa ponderada de Fleiss para varios observadores y varias categorías, así como sus intervalos de confianza al 95%.

RESULTADOS:

El número anual medio de centros participantes en el programa de control de calidad de ASEBIR, que determinó la clasificación de ASEBIR mediante criterios estáticos (Clásicos) fue de 36 centros y el número de centros participantes en el programa de control de calidad externo de morfocinética fue 9 en Embryoscope y 16 en Primo Vision. El índice de concordancia Kappa de Fleiss ponderado entre centros para la clasificación de ASEBIR para Día+2 fue de 0,56 (0,41-0,71) para morfología clásica (estática), de 0,48 (0,29-0,66) para Embryoscope y de 0,48 (0,35-0,62) para Primo Vision. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ni en porcentaje de acuerdo ponderado ni en las Kappas de Fleiss ponderadas para día+2 ni para día +3. Sin embargo si se observaron diferencias significativas en el índice de concordancia de Fleiss para día+5 siendo inferiores en morfología clásica que en morfocinética [0,35 (0,20-0,50) para morfología clásica (estática), 0,67 (0,54-0,80) para Embryoscope y de 0,61 (0,46-0,76) para Primo Vision.]

CONCLUSIONES:

El grado de concordancia observado entre centros en la clasificación de

ASEBIR es moderado para día+2 y día+3, no mejorando con el uso de sistemas de morfocinética. Sin embargo el grado de acuerdo entre centros pasa de

moderado a alto en día+5 con el uso de las plataformas de morfocinética.

P-073 RESULTADOS DE IMPLANTACIÓN DE D3 Y D5 MEDIANTE EL USO CLÍNICO DEL EEVA

A. Delgado Mendive, B. Aparicio Ruiz, S. Pérez Albalá, A. Tejera Pastor, J. Remohí Giménez, M. Meseguer Escrivá
IVI VALENCIA, Valencia
arantza.delgado@ivi.es

INTRODUCCIÓN:

Desde la introducción de los sistemas time lapse en los laboratorios de fecundación in vitro, mucho se ha debatido sobre su verdadera utilidad clínica en la práctica diaria. Autores como Wong en el 2010, ya publicaron algoritmos que relacionaban determinados parámetros morfocinéticos con la capacidad de alcanzar el estadio de blastocisto. Desde entonces se trabaja en la validación clínica de los distintos sistemas time lapse que existen en el mercado.

OBJETIVOS:

Mediante el uso del Eeva, correlacionar las tres categorías proporcionadas (High, Medium y Low) por un algoritmo preestablecido y con unos parámetros determinados (P2 y P3), con las distintas tasas de implantación en dos días distintos (D3 y D5).

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo de una cohorte de 2198 embriones procedentes de nuestro programa de donación de ovocitos durante el periodo comprendido entre Octubre de 2013 y noviembre de 2014. En todos los ciclos la técnica

de fecundación utilizada fue el ICSI y las transferencias se realizaron en D3 o bien en D5, según las indicaciones clínicas establecidas.

RESULTADOS:

Un total de 774 embriones fueron transferidos, si bien los resultados están referidos a aquellos en los que se conoce con certeza la implantación (coincidencia entre el número de sacos y el número de embriones transferidos) resultando una n=518.

Atendiendo a las categorías proporcionadas por el Eeva, se obtuvieron n=146 embriones High, n=123 Medium y n=155 Low. Además, un grupo de n=94 no cumplieron criterios dentro de las categorías establecidas por el software.

Independientemente del día en que se realizó la transferencia, las tasas de implantación por categorías fueron 50%, 39,84% y 33,35%, respectivamente para High, Medium y Low, resultando estadísticamente significativas con (p=0.036).

También se analizaron los resultados en función del día de la transferencia embrionaria (D3-D5) y las tasas de

implantación obtenidas fueron las siguientes: para D3, High 45,13% (CI95% 35.8-54.4) (n=113); Medium 32,95% (n=88) y Low 27,50% (n=120) con (p=0.040).

Respecto al D5, las tasas de implantación fueron High 67,74% (n=31); Medium 53,13% N=32 y Low 57,14% (n=28).

CONCLUSIONES:

Las tasas de implantación obtenidas en el estudio, pueden correlacionarse con las distintas categorías proporcionadas por el Eeva (High, Medium y Low). Además e independientemente del día en que realicemos la transferencia (D3o D5), las tasas de implantación no se ven penalizadas. Al ser un estudio retrospectivo, son necesarios posteriores estudios prospectivos randomizados que confirmen estos datos y que reafirmen al sistema Eeva de utilidad en la rutina asistencial diaria para mejorar los resultados clínicos de los laboratorios de fecundación in vitro.

BIBLIOGRAFÍA:

Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage WONG CC, 2010.

P-074 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE PROGESTERONA POR OVOCITO COMO PREDICTORES DE ÉXITO EN LOS CICLOS DE FECUNDACIÓN IN VITRO CON TRANSFERENCIA EN FRESCO.

S. Rafael Fernandez, M. Vidaurreta Lázaro, T. Gastañaga Holguera, M. Calvo Urrutia, S. Ortega Ricondo, MA. Herraiz Martin
Hospital Clínico San Carlos, Madrid
sara.rafael.f@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

Existe controversia acerca del valor predictivo de los niveles séricos de progesterona en el éxito de los tratamientos de reproducción asistida. Los primeros estudios surgieron en los años 90, pero en la actualidad sigue siendo una cuestión que no ha sido resuelta satisfactoriamente y cada año siguen publicándose numerosos estudios, revisiones y meta análisis. Una de las causas que se han argumentado para explicar estas discrepancias en los resultados son las diferencias en la sensibilidad de los ensayos empleados para la determinación de la progesterona. Por este motivo, es importante que cada centro establezca sus propios valores de referencia para su aplicación clínica.

La progesterona que se detecta en el torrente sanguíneo es la suma de la progesterona secretada por los folículos y una pequeña proporción de la secretada por las glándulas adrenales. La valoración de los niveles de progesterona por ovocito obtenido nos dará una estimación de la progesterona producida en cada folículo. Este nuevo indicador puede ser más representativo y puede funcionar mejor como predictor de éxito en tratamientos con transferencia en fresco. Este parámetro sería indicador del funcionamiento ovárico y puede establecer diferencias

en pacientes con valores similares de progesterona sérica.

OBJETIVOS:

Determinar el valor pronóstico de la progesterona sérica en la probabilidad de embarazo en nuestra población de paciente y establecer un punto de corte. Valorar el efecto de los niveles de progesterona por ovocito en las tasas de embarazo clínico y determinar su valor clínico en relación a la progesterona total.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se realizó un estudio retrospectivo monocéntrico entre Junio de 2014 y Marzo de 2015. Se incluyeron todos los ciclos consecutivos de mujeres entre 18 y 40 años en los que se realizó transferencia en fresco. La progesterona se determinó en el día de la inducción de la ovulación. Se registraron los niveles de estradiol así como las variables del ciclo (número de ovocitos, tasa de fecundación, número y calidad de embriones transferidos, etc). Se valoró la influencia en la tasa de embarazo.

RESULTADOS:

Se analizaron un total de 106 mujeres, con una mediana de edad de 36 años (rango entre 26 y 40 años). La media de niveles de progesterona fue de 0,98

± 0,62 (rango entre 0,09 y 5,3 ng/ml). Cuando se analizó la relación de la progesterona con tasa de embarazo no se obtuvo relación significativa. También se analizó el efecto de la progesterona por ovocito en la tasa de embarazo. Se estableció el punto de corte en 0,25ng/ml/ovocito y se clasificó la variable en dos grupos. Al contrario de lo esperado, se observó que la tasa de embarazo era mayor en aquellos pacientes con valores superiores de progesterona por ovocito ($p=0,07$). Ajustando por la edad, se estableció que la tasa de embarazo era 8 veces mayor en aquellas pacientes con niveles superiores a 0,25 ng/ml de progesterona por ovocito ($p=0,09$). Se debe tener en cuenta que los valores de progesterona en nuestro grupo de pacientes con transferencia en fresco son menores que los presentados en otras cohortes.

CONCLUSIONES:

Este estudio debe ser valorado como un estudio preliminar debido a su tamaño muestral. Es necesario aumentar nuestra cohorte de pacientes para verificar los resultados obtenidos. De confirmarse estos resultados podría ser incluido en la práctica clínica para ajustar los criterios de transferencia en fresco. Especialmente pueden ser útiles en aquellas pacientes con niveles de progesterona próximos al punto de corte.

P-075 VALIDACIÓN RETROSPECTIVA DEL EEVA (EARLY EMBRYO VIABILITY ASSESSMENT). CORRELACION ENTRE LAS DISTINTAS CATEGORIAS DEL EEVA Y LA TASA DE LLEGADA A BLASTOCISTO.

A. Mifsud Giner(1), F. Bronet (2), N. Basile (3), J. Garcia-Velasco (3), J. Remohí (1), M. Meseguer (1)
(1) IVI- Valencia, (2) IVI- Madrid, (3) IVI Madrid
amifsud@ivi.es

INTRODUCCIÓN:

Recientemente, varios sistemas de time-lapse han sido desarrollados y validados en los laboratorios de reproducción asistida. En el 2010 Wong et al desarrollaron un algoritmo morfocinético al que llamaron EEVA (Early Embryo Viability Assessment). Este algoritmo está basado en la combinación dos parámetros: $P2 = t3-t2$ y $P3 = t4-t3$ y predice la tasa de llegada a blastocisto de un embrión. Clasifica los embriones como "High", "Medium" o "Low", haciendo referencia a la probabilidad de un embrión de llegar a formar un blastocisto.

OBJETIVOS:

El objetivo de este estudio fue dilucidar si existe una correlación directa entre la clasificación calculada con el sistema de time-lapse EEVA ("High", "Medium" y "Low") y la tasa de llegada a blastocisto, así como las calidades de los blastocistos en nuestro laboratorio de FIV.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Este estudio retrospectivo incluye a 432 pacientes y un total de 2198 embriones

analizados entre febrero y noviembre del 2014. Los embriones fueron cultivados en un incubador estándar en el que se introdujo el dispositivo de time-lapse EEVA. Este sistema combina tanto la toma de imágenes como la evaluación por software del número de células embrionarias. El porcentaje de "blastocistos de buena calidad" (aquellos con buena masa y trofotodermo; tipo A o B de ASEBIR) también fue analizado y comparado dentro de las distintas categorías del EEVA ("High", "Medium" y "Low").

RESULTADOS:

Del total de 2198 embriones analizados de 432 pacientes, 1307 llegaron al estadio de blastocisto (59.50%). 250 embriones fueron clasificados como HIGH, 529 como MEDIUM y 961 como LOW. El resto, 458, no se pudieron clasificar. Las tasa de llegada a blastocisto según las distintas categorías del EEVA fueron: HIGH: 80.4% (201/250); MEDIUM: 61.1% (323/529); LOW: 52% (509/961), $p < 0.0001$. El porcentaje de blastocistos de buena calidad también descendió a medida que descendemos en la clasificación EEVA, siendo para el grupo HIGH: 44.7% (90/201); MEDIUM: 37.4%

(121/323); LOW: 32.6% (166/509), $p=0.014$. Estos resultados validan la utilización de este algoritmo para la selección embrionaria.

CONCLUSIONES:

La tasa de llegada a blastocisto de un embrión mejora de manera considerable el potencial de implantación del mismo. Mediante el uso de este algoritmo podemos estimar desde las primeras divisiones celulares, que embriones tendrían más probabilidad de alcanzar este estadio y realizar una mejor selección de los mismos. Este tipo de análisis predictivo sería de gran utilidad en aquellas a cohortes embrionarias en las que el cultivo hasta blastocisto no fuese posible, como por ejemplo aquellas con un número de embriones escaso o con calidades comprometidas. También en aquellos laboratorios en los que sería difícil realizar cultivos embrionarios prolongados. Este estudio de validación del test EEVA es hasta la fecha el más amplio realizado.

P-076 VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS CLÍNICOS EN UN PROGRAMA DE CRIOPRESERVACIÓN DE OOCITOS A LARGO PLAZO

A. García Giménez (1), O. Martínez Pasarell (1), O. López Rodrigo (1), A. Mata Vila (1), S. Peón Muñoz (2), L. Bassas Arnau (1)
(1) Fundació Puigvert, Barcelona, (2) Servicio de Ginecología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona
agarcia@fundacio-puigvert.es

INTRODUCCIÓN:

La esperanza de vida de las mujeres tratadas por cáncer durante el período reproductivo ha aumentado mucho durante los últimos años. Ello nos obliga a dar una mayor importancia a los efectos sobre la fertilidad y la función ovárica de los tratamientos genotóxicos empleados. Los métodos actualmente disponibles para preservar la fertilidad en las pacientes oncológicas son varios: congelación de embriones, vitrificación de ovocitos y criopreservación de tejido ovárico. La vitrificación de oocitos debería ser considerada a priori como la mejor opción en aquellas pacientes jóvenes que no tienen pareja, y también en general para evitar los problemas éticos derivados de la generación forzada de embriones. Sin embargo, es importante validar a corto plazo la eficacia de la criopreservación de oocitos para poder consolidar su implantación y poder medir su eficiencia.

OBJETIVOS:

El objetivo del estudio es validar los resultados reproductivos de la técnica para la vitrificación de oocitos, y en general del programa de preservación de la fertilidad en nuestro Centro.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se realizó un estudio prospectivo observacional, en el que 28 parejas infértiles aceptaron someterse a un ciclo de vitrificación de oocitos (VO) tras haber recibido toda la información pertinente por parte del equipo médico.

Se incluyeron parejas que requerían tratamiento de fecundación in vitro (FIV) por esterilidad primaria de origen desconocido o bien por factor masculino leve, en las que la mujer tenía menos de 35 años. También fueron aceptadas pacientes diagnosticadas de síndrome de ovarios poliquísticos y que precisaban un ciclo de FIV. Se incluyeron como controles 80 ciclos de FIV en fresco (FF) realizados durante el mismo período tiempo.

El proceso de vitrificación se realizó en medio Kitazato® y pajuelas Cryotop®. Se vitrificaron-desvitrificaron un total de 246 oocitos MII resultantes de los ciclos de estimulación ovárica controlada. Se realizó ICSI a 170 oocitos usando espermatozoides del cónyuge obtenidos el mismo día, y se realizó transferencia de los embriones bajo tratamiento de inhibición-substitución.

RESULTADOS:

En el grupo de VO la tasa de supervivencia fue del 72%. La tasa de fecundación fue en los grupos VO y FF de 70% y de 60%. El porcentaje de embriones de buena calidad fue del 62% (VO) y 67 % (FF). Una media de 1.9 y 2 embriones fueron transferidos en el grupo de VO y FF respectivamente. Las tasas de embarazo por transferencia fueron del 38% (VO) en comparación con el 48% (FF). Las tasas de implantación fueron del 24% (VO) y 30 % (FF). Dos embarazos (22%) de VO y 3 embarazos (9%) de FF terminaron en abortos.

Se comparó la relación entre el número de oocitos congelados ≤ 5 , 6 a 10 o >10 oocitos y las tasas de gestación por ciclos que fueron respectivamente de 26%, 57% y 38%), tasas de implantación (20% vs 31% vs 22%).

CONCLUSIONES:

La ejecución del presente estudio permite validar los resultados de un programa de criopreservación de oocitos y, en base a la propia experiencia, informar de las posibilidades de éxito para las mujeres que requieren preservar la fertilidad a largo plazo por causas oncológicas.

P-077 PREDICTIBILIDAD DE FORMACIÓN DE BLASTOCISTO EN D+3 Y D+4: ANÁLISIS DE DOS SISTEMAS DE CLASIFICACIÓN EMBRIONARIA

C. De la Cruz Rodrigo, G. Arroyo Cardona, E. Rodríguez García, MJ. Gómez Cuesta, F. Martínez San Andrés, A. Veiga Lluch, M. Boada Palà
HOSPITAL QUIRÓN DEXEUS, Barcelona
crirod@dexeus.com

INTRODUCCIÓN:

La búsqueda del mejor sistema de selección embrionaria que permita identificar y transferir el embrión con mayor potencial implantatorio continúa siendo tema de debate en reproducción humana asistida.

OBJETIVOS:

Analizar dos sistemas de clasificación embrionaria y valorar su capacidad predictiva para distinguir los embriones con mayor probabilidad de alcanzar el estadio de blastocisto.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se realizó un estudio retrospectivo de 39 ciclos de FIV/ICSI con ovocitos frescos de pacientes >40 años, cultivados post-ICSI en un sistema de monitorización continua (Embryoscope?) hasta la transferencia en D+5/+6. Las valoraciones fueron realizadas en: D+2: 43-45h, D+3: 67-69h, D+4: 90-94h, D+5: 114-120h y D+6: 136-140h de acuerdo a dos sistemas distintos de clasificación embrionaria: sistema propio del centro que puntúa los embriones del 1-10, y el nuevo sistema de clasificación ASEBIR (ASEBIR 2015) que clasifica los embriones en 4 categorías (A, B, C, D).

Se estudió la capacidad de ambos sistemas en D+3 para predecir de formación de blastocisto; la capacidad de predicción en D+4 se analizó únicamente para la clasificación ASEBIR.

Así mismo se valoró la correspondencia entre las categorías embrionarias asignadas en D+3 y las asignadas en D+5/+6.

RESULTADOS:

Se analizaron un total de 297 embriones cultivados hasta D+5/+6, de los cuales 192 (64.6%) alcanzaron el estadio de blastocisto siendo 78 (26.3%) de ellos, blastocistos expandidos/hatching.

Según el sistema de clasificación propia en D+3, los embriones clasificados como óptimos (8-10) alcanzaron el estadio de blastocisto en un 35.2% de los casos; el porcentaje de blastocisto fue del 23.1% para los embriones clasificados como 6-7 y de un 11.5% para los embriones clasificados con puntuación ≤ 5 ($p=0.002$).

Según la clasificación ASEBIR en D+3, los embriones tipo A dieron lugar a blastocistos en un 34.6% de los casos, los embriones tipo B en un 34.2%, los tipo C en un 31.3% y los tipo D en un 11.1% (d.n.s). En D+4, el porcentaje de blastocisto obtenido para los embriones tipo A fue del 66.7%, 48% para tipo B, 34.2% para tipo C y 18.9% para tipo D ($p=0.000$).

El análisis de la concordancia en la clasificación embrionaria asignada entre D+3 y D+5/+6 utilizando el sistema propio fue de un 15% para los embriones de categoría (8-10), 9.6% (6-7) y 100% (≤ 5) ($Kappa=0.082$).

De acuerdo a la clasificación ASEBIR, la correspondencia entre D+3 y D+5/+6 fue del 1.9% (A), 15.8% (B), 13% (C) y 90.7% (D) ($Kappa=0.040$).

CONCLUSIONES:

En D+3 el sistema de clasificación propio tiene una predictibilidad superior para el desarrollo a blastocisto que el sistema de clasificación ASEBIR.

El sistema de clasificación ASEBIR en D+4 predice de forma adecuada (y significativamente mejor que en D+3) la formación de blastocisto en D+5/+6.

No se observó concordancia entre la clasificación adjudicada a los embriones en D+3 y D+5/+6 en ninguna de las dos clasificaciones.

La inclusión de la valoración de D+4 en la clasificación dinámica de ASEBIR aporta una mejora importante al sistema ya que presenta un elevado valor predictivo de la formación de blastocisto.

BIBLIOGRAFÍA:

ASEBIR. Cuadernos de embriología clínica. III Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos. 2015 (3ª edición).

P-078 ¿CUAL ES LA MEJOR ESTRATEGÍA PARA PREDECIR LA TASA DE LLEGADA A BLASTOCISTO: LA MORFOCINÉTICA O LA EVALUACIÓN MORFOLÓGICA?

D. Beltrán Torregrosa (1), N Basile (2), F Bronet (2), I Cabañes (2), J García-Velasco (2), M Meseguer (1)

(1) IVI Valencia, Valencia. (2) IVI Madrid, Madrid

Diana.Beltran@ivi.es

INTRODUCCIÓN:

Recientemente, complementaria a la conocida evaluación morfológica de los embriones se están además implementando otras técnicas de evaluación como el time-lapse. En el 2010 Wong et al desarrollaron un algoritmo morfocinético al que llamaron EEVA (Early Embryo Viability Assessment). Este, está basado en la combinación de varios parámetros que predicen la tasa de llegada a blastocisto de un embrión. Esta técnica clasifica a los embriones en 3 categorías dependiendo de su capacidad de llegada a blastocisto.

OBJETIVOS:

Cuantificar mediante un análisis multivariable la tasa de formación de blastocistos de acuerdo a tres categorías predictivas proporcionadas por Eeva (Early Embryo Viability Assessment), además de la evaluación morfológica característica.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Para este estudio incluimos pacientes sometidas a ciclos de inyección intracitoplasmática (ICSI) utilizando ovocitos propios o donados. El cultivo embrionario se realizó en incubadores estándar que incluían múltiples

sistemas Eeva. El test del Eeva incluye un software de seguimiento celular que clasifica a los embriones en tres categorías (alta-media-baja) de acuerdo a su probabilidad de llegar al estadio de blastocisto. Para ese propósito el sistema realiza un algoritmo basado en las variables $P2 = t3 - t2$ (tiempo hasta 3 células - tiempo hasta 2 células) y $P3 = t4 - t3$ (tiempo hasta 4 células - tiempo hasta 3 células). Con el fin de cuantificar la tasa de formación de blastocisto de acuerdo a las 3 categorías proporcionadas por el Eeva realizamos un análisis de regresión logística teniendo en consideración otros posibles factores de posible confusión como: morfología embrionaria de acuerdo a ASEBIR (A; B; C; D), tipo de ovocitos (propios o donados) y número de ovocitos.

RESULTADOS:

Se generaron unos 3596 embriones provenientes de un total de 494 pacientes. La tasa general de formación de blastocisto fue del 59,3% (1347/2269). Sin embargo, cuando categorizamos de acuerdo a las variables del Eeva, encontramos diferencias significativas en la tasa general de dicha formación de estos blastocistos cuando comparamos BAJO vs. MEDIO ($p=0.000$, $OR=1964$ CI95% 1.550-2.489) y BAJO vs. ALTO ($p<0.001$, $OR=3.743$ CI95% 2.724-

5.143). El desarrollo de blastocistos "óptimos" también fue analizado. Además establecimos diferencias significativas entre las categorías BAJO vs. MEDIO ($p=0.000$, $OR=1.634$ CI95% 1.248-2.140) y entre BAJO vs. ALTO ($p<0.000$, $OR=3.053$ CI95% 2.295-4.061). Cuando tomamos en consideración los otros posibles factores de confusión como la morfología, el número y el tipo de ovocitos seguimos encontrando diferencias significativas entre las categorías anteriormente mencionadas, sin embargo observamos una relación reducida en un 21% y 33% cuando comparamos BAJO vs. MEDIO y BAJO vs. ALTO para la tasa general de formación de blastocisto y una disminución del 23% y del 36% cuando comparamos BAJO vs. MEDIO y BAJO vs. ALTO para la tasa de formación del blastocisto "óptimo".

CONCLUSIONES:

Las categorías del Eeva están fuertemente correlacionadas con la tasa de formación del blastocisto en el Laboratorio de FIV. Sin embargo, la predicción de acuerdo a las categorías del Eeva se encuentra significativamente afectada por la morfología del embrión en día 3. Por lo tanto, la mejor estrategia para la predicción de la formación del blastocisto es la combinación de ambos: morfología junto con la morfocinética.

P-079 ¿AFECTA LA CALIDAD SEMINAL A LA CINÉTICA EMBRIONARIA DEL PRIMER CICLO CELULAR?

D. Agudo Garcillán, D. Cernuda, D. Becerra, F. Bronet Campos
IVI Madrid, Madrid
david.agudo@ivi.es

INTRODUCCIÓN:

La tecnología time laps está ofreciendo multitud de datos sobre la cinética del desarrollo embrionario que mejora nuestra capacidad de selección embrionaria. Además hay ya trabajos que han estudiado si la cinética embrionaria se ve afectada por el medio de cultivo, la estimulación ovárica, la tensión de oxígeno, el origen de los ovocitos, la edad de la paciente, aunque pocos han estudiado la influencia del gameto masculino en la cinética embrionaria.

OBJETIVOS:

El objetivo de este trabajo es determinar si la calidad de la muestra de semen podría afectar a la cinética embrionaria del primer ciclo celular.

MATERIAL Y MÉTODOS:

En este estudio se han incluido 118 ciclos de donación de ovocitos cultivados en el incubador embryoscope, de los cuales 80 de ellos (863 ovocitos y 719 embriones) procedían de pacientes con muestras de semen con más de 15 millones/ml, más del 40% de progresivos y más de un 4% de formas normales cultivados en embryoscope hasta día 5 de desarrollo (Grupo A) y 38 ciclos (427 ovocitos y 303 embriones) que procedían de pacientes con muestras de semen menos de 5 millones/ml, menos del 10% de progresivos y menos del 4% de formas

normales cultivados todos ellos en el embryoscope hasta día 5 de desarrollo (Grupo B). Los eventos celulares estudiados fueron los descritos por Aguilar, J. et al 2014 utilizando los intervalos de tiempos descritos en este trabajo como óptimos, que se relacionan con mejores tasas de implantación, para comparar ambos tipos de muestra de semen. Empleamos el programa SPSS para el análisis estadístico.

RESULTADOS:

La tasa de fecundación fue de un 83,31% (863 ovocitos y 719 embriones) frente a un 70,46% (427 ovocitos y 303 embriones), ($p < 0,0001$). La extrusión del segundo corpúsculo polar ocurrió en un 59,80% de los embriones del grupo A dentro de los rangos óptimos descritos y en un 49,17% de los embriones del grupo B en el mismo rango (3,3-10,6 horas post microinyección), $p = 0,0017$. La aparición de los dos pronúcleos no mostró diferencias significativas al comparar entre los dos grupos objetos de estudio. La desaparición de los dos pronúcleos se produjo entre las 22,2-25,9 horas (rango óptimo descrito) en un 62,72% de los embriones ($n = 451$) del grupo A y en un 54,45% de los embriones ($n = 165$) del grupo B resultado la diferencia estadísticamente significativa, $p = 0,0136$. Finalmente se comparó el porcentaje de embriones que presentaban su fase S entre los intervalos óptimos (5,7-13,8 horas) de los dos grupos, encontrándose un

48,53% de embriones en el grupo A (349 embriones) y un 42,24% de embriones en el grupo B (128 embriones) no resultando estadísticamente significativa la diferencia encontrada ($p = 0,0656$).

CONCLUSIONES:

Los resultados de este trabajo muestran diferencias significativas entre los grupos objeto de estudio en cuanto a tasa de fecundación, aparición del segundo corpúsculo y la desaparición de los pronúcleos, y una diferencia tendente a la significatividad en la duración de la fase S. Estos resultados son preliminares siendo necesario incrementar el número de casos para aclarar si las diferencias encontradas se afianzan y analizar más eventos celulares ya que todos los casos fueron cultivados hasta día 5 de desarrollo embrionario, así como obtener resultados de un número suficiente de embriones transferidos con implantación conocida.

BIBLIOGRAFÍA:

Aguilar J., Motato Y., Escriba MJ, Ojeda M., Muñoz E., Meseguer M. The human first cell cycle: impact on implantation. *Reproductive BioMedicine Online* (2014) 28, 475- 484.

P-080 USO DE SCRATCHING ENDOMETRIAL EN TRANSFERENCIAS DE VITRIFICADOS EN AQUELLAS PACIENTES CON UN FALLO PREVIO DE IMPLANTACION.

B. Migueles Pastor, B. Zamorano Alanis, M. Hebles Duvinson, F. Sánchez Martin, P. Sánchez Martin
Ginemed Clínicas, Sevilla
bmigueles@ginemed.es

INTRODUCCIÓN:

La consecución de un embarazo es el resultado de la influencia de diferentes variables. Existen pacientes con una buena respuesta hormonal una buena calidad embrionaria, un buen desarrollo endometrial y sin patología en las que encontramos un fallo repetido de implantación. En estos casos podemos considerar que una subóptima receptividad endometrial es considerada un factor clave en el fallo de la implantación. Durante la ventana de implantación se establece un diálogo entre el endometrio y el embrión que lleva a la adhesión del embrión al endometrio. Esta proreceptividad del endometrio puede estar determinada por la decidualización del estroma y el desarrollo de pinópodos y microvilli en el epitelio luminal. La inducción de un daño local en el endometrio mediante biopsia (scratching) o histeroscopia. Recientemente se ha publicado que en mujeres con fallo repetido de implantación de origen desconocido, la inducción de un daño endometrial en el ciclo previo a la transferencia de embriones mejora las tasas de implantación.

OBJETIVOS:

El objetivo del presente estudio es valorar los resultados obtenidos en pacientes con un fallo previo de implantación y que se realizaron una biopsia endometrial en el ciclo previo a la transferencia de los embriones vitrificados excedentes del ciclo fallido en fresco.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se realizó un estudio retrospectivo en el que se incluyeron pacientes que se sometieron a un ciclo de ICSI en

fresco y no consiguieron embarazo y que posteriormente realizaron la transferencia de los embriones vitrificados excedentes de dicho ciclo. Se incluyeron un total de 861 pacientes con un fallo previo de ICSI entre los años 2013 y 2015 que usaron sus embriones vitrificados en un segundo transfer. 71 de estos pacientes fueron sometidos a scratching endometrial (grupo de estudio) y 790 no se intervinieron previamente a la transferencia de vitrificados. La biopsia se realizó ecoguiada con una cánula de Corner en los 10 días previos al ciclo donde se transfirieron los embriones. No se administró ningún tipo de medicación adyuvante a las pacientes sometidas a la biopsia.

RESULTADOS:

Las tasas de embarazo conseguidas en el grupo de las pacientes que se sometieron al scratching fueron sensiblemente superiores a las obtenidas en el grupo control donde las pacientes no se sometieron a ningún tipo de tratamiento en el ciclo previo. Todos los embarazos fueron confirmados por ecografía con latido fetal positivo

	Numero de pacientes	Embarazos	%
Scratching Endometrial	71	36	50,70%
Sin Scratching Endometrial	790	299	37,84%

CONCLUSIONES:

Los resultados obtenidos muestran que existe una ligera mejoría en las tasas de embarazo de aquellas pacientes que se han sometido a scratching endometrial en el ciclo previo a la transferencia de los embriones excedentes de un ciclo donde no se ha conseguido el embarazo en fresco.

Aunque estamos pendientes de incrementar el número de casos en el estudio, podemos concluir que el scratching endometrial en el ciclo previo a la transferencia de embriones vitrificados puede incrementar las tasas de embarazo.

BIBLIOGRAFÍA:

Dunn, L., Kelly, W., Critchely, H., 2003. Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. *Reprod. Biomed. Online* 7,151-161.

Gnainsky Y, Granot I, Aldo P.B, Barash A, Or Y. Local injury of the endometrium induces an inflammatory response that promotes successful implanation. *Fertil Steril* 2010 November; 94(6):2030-2036.

Potdar, N., Gelbaya, T., Nardo, L.2012. Endometrial injury to overcome recurrent embryo implantation failure: a systematic review and meta-analysis. *Reprod. Biomed. Online* 25 561-571.

P-081 RESULTADOS DE LA TRANSFERENCIA DE 1 VS 2 BLASTOCISTOS EN UN PROGRAMA DE DONACIÓN DE OVOCITOS

A. Rabanal Anglada, M. Grossmann Camps, C. Selva Viñals, C. Guix Galcerán, R. Olivares Vela, O. Serra Ortiz, L. Zamora Corzo
 Barcelona IVF, S.L.P, Barcelona
anna.rabanal@bcnivf.com

INTRODUCCIÓN:

Las guías europeas de buena práctica recomiendan la transferencia de un único embrión para evitar los embarazos múltiples. En nuestro programa de donación de ovocitos con cultivo a blastocisto recomendamos transferencia de un solo embrión como primera opción. En algunos casos de fracasos previos o por solicitud expresa de la pareja realizamos transferencia de dos embriones.

OBJETIVOS:

El objetivo del estudio es evaluar las tasas de gestación e implantación en el grupo de pacientes que aceptó la transferencia de un único embrión (SET) frente al grupo de pacientes que decidieron la transferencia de dos embriones (Doble ET)

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo de 96 pacientes que se encuentran en el programa de donación de ovocitos tras fracaso de FIV. En todos los casos la única causa de esterilidad fue por un problema ovocitario.

Ambos grupos son comparables en cuanto a edad e IMC de la mujer.

Los ciclos de las receptoras se sincronizaron con la estimulación de la donante para realizar la transferencia de los embriones en fresco. La preparación endometrial se realizó con Valerato de Estradiol (8 mg/día) y Progesterona micronizada (600 mg/día) En todos los ciclos la transferencia se realizó en dos tiempos bajo control ecográfico.

Tras la obtención de los óvulos de la donante, se realizó microinyección en todos los ovocitos MII. Los embriones que presentaron 2PN/2CP se cultivaron

en medios secuenciales (Vitrolife G-Series ©) hasta D+5 de desarrollo embrionario. En el momento de la transferencia se eligió el blastocisto de mejor calidad siguiendo la clasificación Gardner.

Se realiza estudio estadístico mediante Chi-cuadrado y Fisher Exact Test con $p < 0.05$.

RESULTADOS:

En la siguiente tabla, se muestran los resultados de cada grupo:

Nº de pacientes	Nº ovocitos	Nº MII	2 PN	Nº BLASTOCISTOS TOTALES	Pvalue
SET (n= 43)	420	369	289	155	n.s
Doble ET (n=53)	625	512	403	200	n.s

No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los dos grupos en cuanto al nº de ovocitos totales, nº de ovocitos MII, nº de embriones en estadio de 2PN ni en el nº de blastocistos totales (transferidos y congelados).

Cuando se valoró la tasa de gestación e implantación en cada grupo, los resultados mostraron diferencias significativas:

	Nº de TRANSFERS	Tasa de gestación	Tasa implantación	P value
SET	43	48,9%	48,9 %	P<0.05
Doble ET	53	77,4 %	53,7 %	P<0.05

En el grupo de SET, se valoró también la tasa de gestación acumulada en la primera criotransferencia del mismo ciclo. En los primeros resultados valorados, la tasa de gestación acumulada fue del 58,2 % a la espera de los últimos resultados.

En el grupo que transfirió dos blastocistos se valoró la tasa de gestación gemelar que fue del 40,2 %

CONCLUSIONES:

La tasa de gestación en el grupo en el que se transfirieron dos blastocistos fue superior a la del grupo que transfirió un único blastocisto pero con una elevada tasa de gestación gemelar.

Con estos resultados, consideramos que hay que aconsejar a las pacientes la transferencia de un único embrión en estadio de blastocisto para contener la elevada tasa de gestación gemelar.

Porotroladoya la espera de los resultados

finales, ambos grupos pueden alcanzar la misma tasa de gestación, aunque en las transferencias de embrión único será necesario realizar un mayor nº de intentos para conseguir las.

P-082 RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE DIÓXIDO DE NITRÓGENO AMBIENTAL (NO₂) DURANTE EL CULTIVO EMBRIONARIO Y LA TASA DE ÉXITO EN LOS CICLOS DE FECUNDACIÓN IN VITRO (FIV)

M. Sánchez Toledo, C. Álvarez Lleó, M. Resta Serra, C. García Garrido, G. González De Merlo
Hospital General Universitario de Albacete, Albacete
meri_santo@hotmail.com

INTRODUCCIÓN:

En los últimos años existe un interés creciente sobre cómo puede afectar los tóxicos químicos y la contaminación ambiental en la fertilidad humana. Los gases derivados de la combustión interna de los motores son los principales contaminantes en entornos urbanos y uno de los principales productos tóxicos derivados son los óxidos de nitrógeno.

Existen muchos estudios que analizan una posible relación entre la polución ambiental y el parto prematuro, el bajo peso al nacer y la fertilidad espontánea, pero tenemos muy poca literatura que relacione la concentración de tóxicos ambientales como los óxidos de nitrógeno y los resultados de FIV.

OBJETIVOS:

Estudiar la relación existente entre la concentración de NO₂ ambiental durante los días del cultivo embrionario y la tasa de gestación y de recién nacido vivo en mujeres sometidas a un ciclo de FIV.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo con 351 mujeres que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI con transferencia embrionaria en día 2, entre enero de 2013 y julio de 2014. Los datos de contaminantes ambientales fueron obtenidos diariamente a través

de los datos recogidos por la red de calidad del aire de nuestra ciudad.

La concentración media durante el periodo de estudio de NO₂ ambiental fue de 12.16 µg/m³. Comparamos la tasa gestación clínica y de recién nacido vivo como resultados del ciclo de FIV en función de si se superaba el umbral medio de contaminación durante alguno de los días de cultivo.

RESULTADOS:

Observamos un aumento estadísticamente significativo en la tasa de gestación (OR: 1,89 IC 95%: 1.12-3.21. p= 0.017) y en la tasa de recién nacido vivo (OR: 1.87, IC 95%: 1.10-3.18 p= 0.021) durante aquellos días del cultivo embrionario en los que las concentraciones de NO₂ se encontraban por debajo de la media (n=85).

CONCLUSIONES:

Elevadas concentraciones de NO₂ ambiental tienen un efecto deletéreo sobre la tasa gestación y de recién nacido vivo en mujeres que se someten a un ciclo de FIV. Aunque son necesarios más estudios que aborden un mayor periodo de tiempo durante el ciclo, como sería el periodo de estimulación e implantación, nuestros resultados concuerdan con otro estudio realizado por Legro et al. (2010) en el que obtuvieron resultados similares.

Una de las principales fuentes de NO₂ son los motores de los coches, por lo que podríamos afirmar que la congestión en el tráfico en grandes ciudades puede afectar a las tasas de éxito en Fecundación In Vitro.

BIBLIOGRAFÍA:

Legro RS, Sauer MV, Mottla GL, Richter KS, Li X, Dodson WC, Liao D. Effect of air quality on assisted human reproduction. *Hum Reprod.* 2010 May;25(5):1317-24. doi: 10.1093/humrep/deq021. Epub 2010 Mar 13.

Perin PM, Maluf M, Czeresnia CE, Nicolosi Foltran Januário DA, Nascimento Saldiva PH. Effects of exposure to high levels of particulate air pollution during the follicular phase of the conception cycle on pregnancy outcome in couples undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril.* 2010 Jan;93(1):301-3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.06.031. Epub 2009 Jul 23.

Nieuwenhuijsen MJ, Basagaña X, Dadvand P, Martinez D, Cirach M, Beelen R, Jacquemin B. Air pollution and human fertility rates. *Environ Int.* 2014 Sep;70:9-14. doi: 10.1016/j.envint.2014.05.005. Epub 2014 May 28.

Foster WG1, Neal MS, Han MS, Dominguez MM. Environmental contaminants and human infertility: hypothesis or cause for concern? *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2008 Mar;11(3-4):162-76. doi: 10.1080/10937400701873274.

P-083 EFECTO DE LA MÚSICA COMO AGENTE FÍSICO EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO

I. Ochando Sánchez (1), J. Ten Morro (2), A. Rodríguez Arnedo (2), MD. Pérez Izquierdo (3), J. Guerrero Villena (3), B. Moliner Renau (3), R. Bernabéu Pérez (3)

(1) Instituto Bernabeu Albacete, (2) Instituto Bernabeu Alicante, (3) Instituto Bernabeu Cartagena

jten@institutobernabeu.com

INTRODUCCIÓN:

Existe gran variedad de cultivos embrionarios experimentales con el fin de intentar conseguir embriones con mayor capacidad implantatoria. Algunos de estos ejemplos se centran en reproducir los movimientos peristálticos que se producen en las trompas de Falopio y en el útero mediante pequeñas vibraciones aplicadas a las placas de cultivo embrionario.

Las ondas sonoras desplazan cantidades de energía capaces de generar respuestas en el estado emocional e incluso físico de los seres vivos.

Además, estudios realizados en fibroblastos reflejan que la música facilita la división y diferenciación de este tipo celular. Ensayos recientes revelan un incremento de un 5% de la tasa de fecundación cuando los ovocitos son expuestos a cualquier tipo de música (clásica, pop, etc) durante todo el cultivo embrionario. Esa mejora en la tasa de fecundación se atribuye a las microvibraciones producidas por el altavoz repartiendo de manera más homogénea los componentes de los medios de cultivo.

En este estudio se expusieron los embriones a música eliminando

dichas vibraciones con la utilización de planchas de poliestireno sobre las que se colocaron los altavoces con el objetivo de estudiar el efecto que producen las ondas musicales sobre los embriones humanos.

OBJETIVOS:

El objetivo del estudio fue determinar si la exposición a música clásica como agente físico (eliminando vibraciones) mejora la calidad embrionaria y la tasa de formación de blastocisto en pacientes receptoras de ovocitos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Los embriones del estudio procedieron de 26 pacientes receptoras de óvulos. Cada cohorte embrionaria del estudio fue separada en dos mitades. Una mitad (control) fue cultivada en condiciones normales y la otra mitad fue expuesta a la pieza musical "Canon Cancrizans" para clavicordio del compositor J.S. Bach a una intensidad de 90-100 dB durante 1 hora diaria.

RESULTADOS:

Los resultados obtenidos reflejan que no existen diferencias significativas entre el número de embriones de buena calidad en D2, D3 y D5 de

desarrollo ($p=0,877$; $p=0,606$; $p=0,914$, respectivamente) ni en la tasa de formación de blastocisto ($p=0,734$) en los dos grupos de estudio. No obstante, si se observa una tendencia a encontrar una mayor cantidad de embriones de buena calidad en D5 y una mayor tasa de formación de blastocisto en el grupo de embriones expuestos a música con respecto al control (18% vs 12% y 65% vs 57%, respectivamente).

CONCLUSIONES:

Podemos concluir que la exposición a música clásica de embriones humanos no parece afectar a la calidad y a la diferenciación celular de los mismos. De igual modo, la formación de blastocistos tampoco se ve influenciada por la música.

Un trabajo en el que el tamaño muestral y la exposición a música sean mayores podría arrojar más luz sobre la existencia o no de un efecto directo de la música como agente físico sobre la calidad y desarrollo de embriones humanos cultivados "in vitro".

P-084 FOSFORILACIÓN DE TIROSINA EN EL ESPERMATOZOIDE HUMANO DURANTE LA CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSÓMICA.

P. Sáez Espinosa (1), J. Luna Romero (1), A. Romero Rameta (1), J. Aizpurua (2), M.J. Gómez Torres (3)

(1) Departamento de Biotecnología, Universidad de Alicante, San Vicente de Raspeig, Alicante., (2) Clínica IVF Spain y Cátedra Human Fertility, (3) Departamento de Biotecnología de la Universidad de Alicante y Cátedra Human Fertility

paula.saez08@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

La fosforilación de la tirosina en el espermatozoide se asocia con hiperactivación de la movilidad, capacitación, unión a zona pelúcida, reacción acrosómica y fusión de membranas; procesos requeridos para completar con éxito la fecundación del ovocito. No obstante, la importancia de la fosforilación de tirosina tras la reacción acrosómica es poco conocida en la especie humana.

OBJETIVOS:

Realizar un análisis comparativo de la localización de tirosina fosforilada en diferentes estados funcionales en el espermatozoide: antes, tras capacitación espermática *in vitro* (1h y 4h) e inducción de la reacción acrosómica.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Las muestras fueron obtenidas de 6 donantes normozoospermicos (OMS, 2010) bajo consentimiento informado. La capacitación espermática a 1h y 4h se llevó a cabo mediante selección por swim-up (37°C y 5% CO₂) y posteriormente, la inducción de la reacción acrosómica con ionóforo de calcio A23187 durante 1h (37°C y 5% CO₂). Los patrones de marcaje fueron revelados con inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo anti-fosfotirosina (PY20) y como mínimo se evaluaron 200 espermatozoides por muestra. La reacción acrosómica fue evaluada mediante inmunofluorescencia directa utilizando la lectina *Pisum sativum* agglutinin (PSA) conjugada con FITC (FITC-PSA). Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante la distribución t de Student.

RESULTADOS:

Los resultados muestran que el porcentaje de espermatozoides capacitados que presentan fosforilación se incrementa significativamente entre 1h (34%) y 4h (44%), siendo más numeroso el patrón de marcaje a nivel de la pieza principal con respecto a la región cefálica. Al valorar la fosforilación tras la inducción de la reacción acrosómica, observamos una disminución ($p < 0,05$) en el porcentaje de marcaje a nivel de cabeza (~80%) y de flagelo (~35%) en ambos tiempos considerados, con respecto a los espermatozoides en los que no se indujo la reacción acrosómica. Cuando consideramos toda la población espermática tras la inducción de la reacción acrosómica, aquellos que fueron capacitados durante 4h presentaron un aumento significativo en el porcentaje de fosforilación a nivel del flagelo (~22%), frente a los seleccionados en 1h (~15%).

CONCLUSIONES:

Coincidiendo con trabajos previos, observamos que la fosforilación a nivel del flagelo se incrementa en aquellos espermatozoides que capacitaron durante 4h. Los resultados demuestran que la inducción de la reacción acrosómica promueve la pérdida significativa del marcaje de los residuos de tirosina fosforilada sobre la región cefálica en espermatozoides humanos, al igual que se ha visto en otras especies.

Asimismo, sugieren que la fosforilación de tirosina presente a nivel del flagelo, una vez desencadenada la reacción acrosómica, tiene un papel clave en las siguientes etapas de interacción entre el espermatozoide y el ovocito.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Buffone MG, Calamera JC, Verstraeten SV, Doncel GF. Capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation and membrane fluidity changes are impaired in the spermatozoa of asthenozoospermic patients. *Reproduction* 2005;129:697-705.
2. Buffone MG, Doncel GF, Marin Briggiler CI, Vazquez-Levin MH, Calamera JC. Human sperm subpopulations: relationship between functional quality and protein tyrosine phosphorylation. *Hum Reprod* 2004;19:139-46.
3. Grasa P, Colas C, Gallego M, Monteagudo L, Muino-Blanco T, Cebrian-Perez JA. Changes in content and localization of proteins phosphorylated at tyrosine, serine and threonine residues during ram sperm capacitation and acrosome reaction. *Reproduction* 2009;137:655-67.
4. Liu DY, Clarke GN, Baker HW. Tyrosine phosphorylation on capacitated human sperm tail detected by immunofluorescence correlates strongly with sperm-zona pellucida (ZP) binding but not with the ZP-induced acrosome reaction. *Hum Reprod* 2006;21:1002-8.
5. Sakkas D, Leppens-Luisier G, Lucas H, Chardonnes D, Campana A, Franken DR, et al. Localization of tyrosine phosphorylated proteins in human sperm and relation to capacitation and zona pellucida binding. *Biol Reprod* 2003;68:1463-9.
6. Urner F, Sakkas D. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction* 2003;125:17-26.

P-085 KARYOMAPPING COMO ALTERNATIVA PARA LA DETECCIÓN DE UNA MUTACIÓN NO DETECTABLE MEDIANTE DGP CONVENCIONAL

C. Giménez Sevilla (1), J. Sarasa (2), C. Arjona Fernández (1), E. Vilamajó (3), K. Wheeler (3), G. Valls Ricart (3), M. Sandalinas Alabert (1), E. García Guixé (1), D. Wells (3)

(1) Reprogenetics Spain, Barcelona, (2) Reprogenetics UK, (3) Instituto de Reproducción Cefer, Lleida
litus@reprogenetics.es

INTRODUCCIÓN:

El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) permite la detección de anomalías genéticas en el embrión antes de su transferencia al útero materno. Se realizó DGP en una pareja portadora de una gran deleción en el gen TSC2. Las alteraciones en este gen cursan con una enfermedad conocida como esclerosis tuberosa. Se trata de un trastorno multisistémico que se hereda de manera autosómica dominante caracterizado por hamartomas en el cerebro, piel, ojos, corazón, pulmones y riñones. Es esencial el diagnóstico certero para detectar y tratar las lesiones sintomáticas (neurológicas, renales, cardíacas y, a veces, pulmonares), que son la principal causa de muerte.

OBJETIVOS:

Evaluar la utilidad de la técnica del Karyomapping (Handyside et al., 2010; Natesan et al., 2014) en casos de grandes deleciones.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Mujer de 32 años afectada de esclerosis tuberosa. El análisis mediante MLPA en DNA genómico de la paciente mostró una deleción de novo de los exones 1 a 15 así como de la región 5 del gen TSC2.

Se localizan microsatélites up y downstream del gen implicado así como SNP s dentro de la región delecionada.

Posteriormente se utilizó el Karyomapping, que se trata de una array de SNP s localizados a lo largo de todo el genoma, para establecer la fase alélica de los SNP s.

También se utilizan arrays de CGH para realizar un screening de aneuploidías en los embriones.

Tras dos ciclos de IAC y uno de FIV sin DGP seguido de un CT todos con resultado negativo, la pareja accedió a la realización de un ciclo de FIV-ICSI-DGP mediante Karyomapping+aCGH. La biopsia se realizó en estadio de blastocisto y los embriones biopsiados fueron criopreservados hasta la obtención del diagnóstico.

RESULTADOS:

Veinte y seis SNP s dentro de la región delecionada fueron valorados para su uso en un DGP convencional. De ellos, solo cinco fueron parcialmente informativos, por lo que la estrategia únicamente permitía diagnosticar la mitad de los embriones no portadores. Por este motivo la pareja, tras asesoramiento genético, decidió no utilizar la estrategia convencional.

Tras valorar las muestras de DNA de la pareja mediante Karyomapping, se observó que era posible el seguimiento de la deleción en los embriones, por lo que se planteó esta nueva opción a la pareja que dio su consentimiento.

Se realizó biopsia de trofoblasto en 7 blastocistos. El tejido biopsiado fue sometido a una amplificación total del genoma seguida por aCGH y Karyomapping. Tras el análisis, tres blastocistos fueron clasificados como euploides y no portadores. Los resultados obtenidos referentes al screening de aneuploidías coincidieron entre ambas técnicas. Se consiguió un embarazo único en la segunda transferencia.

CONCLUSIONES:

El protocolo de Karyomapping utilizado ha permitido el DGP en un caso en el que la aproximación convencional mediante PCR y ligamiento no era posible. Aunque la técnica de Karyomapping precisa habitualmente de estructura familiar para establecer el haplotipo de riesgo, en este caso en concreto se utilizó para detectar la deleción de forma directa en los embriones de la pareja.

Si bien la técnica de Karyomapping permite detectar la mayoría de aneuploidías que afectan a embriones preimplantacionales humanos, todavía no ha sido validada para ese fin. Por ello, se utilizaron arrays de CGH para el screening de aneuploidías, con idéntico resultado.

Finalmente, la técnica permitió refinar el tamaño de la deleción hasta los 210kb.

Este estudio confirma el Karyomapping como una potente y versátil aproximación al diagnóstico genético preimplantacional de enfermedades monogénicas, con posibilidades de ir más allá del análisis por ligamiento.

BIBLIOGRAFÍA:

Handyside, A.H., Harton, G.L., Mariani, B., Thornhill, A.R., Affara, N., Shaw, M-A., Griffin, D.K., 2010. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *J. Med. Genet.* 47:651-658.

Natesan, S.A., Bladon, A.J., Coskun, S., Qubbaj, W., Prates, R., Munne, S., Coonen, E., Dreesen, J.C., Stevens, S.J., Paulussen, A.D., Stock-Myer, S.E., Wilton,

L.J., Jaroudi, S., Wells, D., Brown, A.P., Handyside, A.H., 2014. Genome-wide karyomapping accurately identifies the

inheritance of single-gene defects in human preimplantation embryos in vitro. *Genet. Med.* 16(11):838-845.

Yates, J.R.W., 2006. Tuberous sclerosis. *Eur. J. Hum. Genet.* 14:1065-1073.

P-086 RELACIÓN ENTRE CALIDAD EMBRIONARIA Y PRESENCIA DE DIVISIÓN DIRECTA

S. Tabar Roquet, M. Rius Mas, I. Boiso Fedorovsky, C. Mangrané Brasa, N. Rives Enedáguila, M. Martín Gallardo, J. Herrero García, JJ. Espinós Gómez, L. Marquès Soler
Centre de Reproducció Assistida Clínica Sagrada Família, Barcelona
labfiv@crasafa.com

INTRODUCCIÓN:

La incubación de embriones con sistema time-lapse ha supuesto un avance para la Reproducción Asistida. Éste nuevo sistema, permite mantener interrumpidamente las condiciones de cultivo durante todo el desarrollo embrionario, además de una continua evaluación. Se evita la manipulación de embriones fuera del incubador y la exposición de cambios de luz, humedad, temperatura y pH.

El sistema time-lapse posibilita valorar la morfología y la cinética del embrión, proporcionando una mejor selección.

OBJETIVOS:

Publicaciones recientes demuestran un incremento del potencial implantatorio del embrión a través del análisis morfocinético utilizando el sistema time-lapse.

Algunas de las anomalías que se pueden observar en la cinética del embrión es la división de una célula a tres células sin pasar por el estadio de 2 células, división directa (Dd), o cuando la duración del estadio de 2 células es inferior a 5 horas (cc2<5h).

En el presente estudio se pretende determinar si existe una relación entre calidad embrionaria y presencia tanto de Dd como de cc2<5h.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio comparativo de calidades

morfológicas entre embriones que presentaron Dd o cc2<5h vs los embriones sin ninguna de estas anomalías, es decir con una duración del estadio de 2 células igual o superior a 5 horas (cc2≥5h).

Se analizaron 397 embriones en día 2 (d+2) y día 3 (d+3), procedentes de 75 pacientes. Se utilizó el sistema time-lapse (Embryoscope) y el sistema de valoración morfológica de ASEBIR. Los embriones se incubaron en una placa (EmbryoSlide) con medio único GTL (Vitrolife), y en condiciones de cultivo de 37°C, 6%CO₂ y 5%O₂.

RESULTADOS:

Se observaron 20 embriones con presencia de Dd (5%), 78 embriones con cc2<5h (19,7%) y 299 sin ninguna de estas anomalías (75,3%).

Los embriones con Dd tuvieron una proporción significativamente inferior en d+2 de calidades A y B respecto a los embriones cc2≥5h, (0%vs16%, p=0; y 0%vs24%, p=0) y una proporción significativamente superior de calidades C y D (25%vs14%, p=0.02, y 75%vs45%, p=0). En d+3 se observó una menor proporción de calidades A y B en el grupo Dd respecto a cc2?5h (0%vs35%, p=0, y 0%vs18%, p=0), una menor proporción en el grupo Dd respecto a cc2≥5h de calidad C, sin diferencias significativas (10%vs15%) y una mayor proporción de calidad D en el grupo Dd respecto a cc2≥5h significativamente diferente (90%vs53%, p=0).

Los embriones cc2<5h mostraron una proporción significativamente inferior de calidades A y B respecto a los cc2≥5h en d+2 (3%vs16%, p=0; y 8%vs24%, p=0), una proporción significativamente superior de calidad C en el grupo cc2<5h respecto a cc2≥5h (31%vs14%, p=0) y una tendencia a una mayor proporción de calidad D en el grupo cc2<5h respecto a cc2≥5h (59%vs45%). En d+3 se observó menor proporción de calidad A en embriones cc2<5h respecto a cc2 ≥5h (0%vs14%, p=0), una menor proporción de calidad B en cc2<5h que en cc2 ≥5h (14%vs18%), sin diferencias significativas. Las calidades C y D en d+3 fueron significativamente superiores en cc2<5h comparado con cc2 ≥5h (24%vs15%, p=0 y 61%vs53%, p=0.01).

En Dd hubo menor proporción de calidades B y C respecto a cc2<5h tanto en d+2 como d+3 (B: 0%vs8%, p=0,06 y 0%vs14%, p=0; C: 25%vs31%, p=0.282 y 10%vs24%, p=0.001). En Dd tanto en d+2 como d+3 hubo más proporción de calidad D (75%vs59%, p=0.001 y 90%vs62%, p=0).

CONCLUSIONES:

Los datos de este estudio señalan que la presencia de división directa y presencia de un estadio de 2 células inferior a 5 horas, conllevan una peor calidad morfológica respecto a los embriones con un estadio de 2 células igual o superior a 5 horas. Los embriones con división directa tienen peor pronóstico que los embriones con el estadio de 2 células inferior a 5 horas

BIBLIOGRAFÍA:

- Yanhe Liu, M.Sc, Vincent Chapple, M.B., B.S., F.R.A.N.Z.C.O.G., M.R.Med., Peter Roberts, Ph.D., Phillip Matson, Ph.D. Prevalence, consequence, and significance of reverse cleavage by human embryos viewed with the use of the Embryoscope time-lapse video system. *Fertil Steril*. 2014 Nov;102(5):1295-1300.e2.

-Daniel J. Kaser and Catherine Racowsky. Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic

review. *Hum Reprod Update*. 2014 Sep-Oct;20(5):617-31.

-Irene Rubio, Ph.D., Arancha Galán, Ph.D., Zalao Larreategui, Ph.D., Fernando Ayerdi, Ph.D., Jose Bellver, M.D., Javier Herrero, Ph.D., and Marcos Meseguer, Ph.D. Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the Embryoscope. *Fertil Steril*. 2014 Nov;102(5):1287-1294.e5

- Marcos Meseguer, Javier Herrero, Alberto Tejera, Karen Marie Hilligsoe, Niels Birger Ramsing, and Jose Remohí. The

use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod*. 2011 Oct;26(10):2658-71

- Kelly Athayde Wirka, M.S., Alice A. Chen, Ph.D., Joe Conaghan, Ph.D., Kristen Ivani, Ph.D., and Shehua Shen, M.D. Atypical embryo phenotypes identified by time-lapse microscopy: high prevalence and association with embryo development. *Fertil Steril*. 2014 Jun;101(6):1637-48.e1-5.

P-087 INFLUENCIA DE LA TÉCNICA DE FECUNDACIÓN ANALIZADA MEDIANTE UN SISTEMA TIME-LAPSE AUTOMÁTICO

A. Leza García (1), E. Rocafort (1), M. Guijarro (1), L. Medrano (1), B. Ramos (1), L. García (1), I. Vilella (1), M. Velasco (2), Y. Franco (2), M. Fernández (1)

(1) IVF SPAIN, Alicante. (2) IVF DONOSTI, San Sebastián
alezag00@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

En la actualidad la ICSI se utiliza ampliamente, incluso en casos con buen pronóstico para la FIV convencional (FIVc). La principal ventaja en la utilización de ICSI frente a FIVc sería la de evitar posibles fallos de fecundación, sin embargo, no se sabe con certeza cuál es la repercusión de la ICSI sobre la calidad embrionaria, así como sus consecuencias clínicas. Recientemente, se dispone de un sistema de time-lapse automático (Eeva*) que, basándose en parámetros morfocinéticos embrionarios tempranos, podría predecir la formación de blastocisto, entre otros. Sin embargo, no se ha demostrado si la técnica de fecundación de los ovocitos podría influir en esta predicción.

OBJETIVOS:

Analizar la posible influencia de la técnica de fecundación sobre el potencial de desarrollo de los embriones, medido en términos de tasa de formación de blastocisto (BR) y de blastocistos de buena calidad (GQBR), mediante el empleo de un sistema

time-lapse automático. Así como, comparar los resultados clínicos entre ambos grupos, en términos de tasa de embarazo (PR) e implantación (IR) basándonos en la predicción aportada por el sistema de time-lapse.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio unicéntrico y retrospectivo (Sept 2013 - Dic 2014). Un total de 86 pacientes de nuestro programa de ovodonación con muestras de semen normozoospermicas fueron incluidos en el estudio. En cada ciclo se realizó FIVc e ICSI (fecundación mixta) y los cigotos obtenidos con ambas técnicas de fecundación se cultivaron en Eeva*. Eeva* es un sistema de time-lapse automatizado que proporciona en Día 3 de cultivo una predicción (High/Medium/Low) de acuerdo a los parámetros morfocinéticos P2 (tiempo de división de 2 a 3 células) y P3 (tiempo de 3 a 4 células). Los embriones se cultivaron hasta día 5 y se transfirieron en fresco. Los embriones transferidos fueron seleccionados en base a morfología y mediante la predicción Eeva*. Se confirmó el embarazo bioquímico con BhCG >5 y el embarazo

clínico e implantación mediante confirmación de saco gestacional en la semana 6-7 de embarazo. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante SPSS.

RESULTADOS:

Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos FIVc e ICSI en cuanto a BR (63.7%, 205/322 vs. 57.2%, 291/509, $p=0.0001$) and GQBR (49.4%, 159/322 vs. 36.5%, 186/509, $p=0.0001$). También se observó una proporción mayor de embriones High en FIVc con respecto a ICSI con significación estadística (36%, 116/322 vs. 28.9%, 147/509, $p=0.019$). Curiosamente, la proporción de blastocistos High no fue significativamente diferente entre ambos grupos (84.5%, 98/116 vs. 76.9%, 113/147, $p=0.09$). Cuando se transfirieron solamente embriones FIVc o ICSI, no se observaron diferencias significativas en PR bioquímica (72.7%, 24/33 vs. 67.7%, 21/31, $p=0.4$), PR clínica (57.6%, 19/33 vs. 64.5%, 20/31, $p=0.38$) y IR (49%, 25/51 vs. 52.2%, 24/46, $p=0.45$).

CONCLUSIONES:

A pesar de obtener mejor rendimiento embrionario de FIVc con respecto a la ICSI en términos de tasa de blastocisto y blastocistos de buena calidad, estos resultados no se ven reflejados en términos clínicos. Se precisarían futuros

estudios que permitieran conocer si este mejor rendimiento embrionario se ve reflejado en tasa de embarazo acumulativo. Curiosamente, aunque la técnica de fecundación determina una mayor proporción de embriones tempranos con buena predicción de los parámetros morfocinéticos del

sistema Eeva*, ésta no se ve reflejada cuando cultivamos a blastocisto, indicando que la tasa de blastocisto asociada a la predicción morfocinética es independiente de la técnica de fecundación.

P-088 VALIDACIÓN DEL TEST SCSA, ¿ES UNA ALTERNATIVA PARA EVALUAR LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO (DFI) MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO (FC)?

I. Vilella Amorós (1), L. García Valverde (1), MC. García Poyo (1), P. Martínez Ortiz (1), M. Fernández Pérez (1), MJ. Gómez Torres (2), Y. Franco Iriarte (3), J. Aizpurua Sáenz (1)

(1) IVF Spain, Alicante. (2) Departamento de Biotecnología (Universidad de Alicante), Alicante. (3) IVF Donosti, San Sebastián

i.vilella@ivf-spain.com

INTRODUCCIÓN:

La Fragmentación del ADN espermático se ha convertido en un biomarcador para la infertilidad masculina porque se ha demostrado que podría causar defectos en el desarrollo del embrión, riesgo de pérdida de embarazo temprano o problemas con el desarrollo fetal. Se han desarrollado varias técnicas para la medición del DFI donde los estudios han comparado la especificidad y sensibilidad de estas técnicas (Ribas-MAYNOU, 2013). Su similitud, complementariedad y compatibilidad se están discutiendo ya que cada técnica se basa en diferentes marcadores del ADN para medir la fragmentación.

OBJETIVOS:

El principal objetivo es establecer cuál es la técnica más óptima para evaluar el daño en el ADN espermático a nivel clínico. Se comparan los dos métodos clásicos, SCD y TUNEL, con el SCSA, una nueva técnica implementada en nuestro laboratorio: ¿Estas tres técnicas miden lo mismo? ¿Cuál puede mejorar el flujo de trabajo en el laboratorio?

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se recogieron un total de 30 muestras espermáticas de pacientes normozoospermicos después de 2 días

de abstinencia sexual desde Febrero hasta Abril de 2015 en el laboratorio de Andrología de IVF Spain. Se analizaron todas las muestras en fresco y el DFI se midió utilizando 3 métodos diferentes: SCD, TUNEL y SCSA.

Todas las muestras se centrifugaron 8 minutos a 600 g con medio de lavado. Una vez lavada la muestra, se llevó a cabo la medición de la Fragmentación del ADN. El ensayo TUNEL se realizó usando el kit de detección de muerte celular in situ (In Situ Cell Death Detection Kit) por microscopia de fluorescencia, la metodología del SCSA fue mediante citometría de flujo y el SCD test se llevó a cabo mediante el kit de Halosperm®.

RESULTADOS:

Los valores de DFI no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Esto significa que las tres técnicas, SCSA, SCD y TUNEL, son parcialmente redundantes y sobre todo miden el mismo daño.

Para cada ensayo, se calculó el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado de la muestra total. Las comparaciones del DFI entre los diferentes grupos fue evaluado como en estudios preliminares mediante el ANOVA test para un factor con medidas repetidas. Todos los test estadísticos

fueron evaluados teniendo en cuenta el 95% del intervalo de confianza. Se excluyeron las desviaciones sistemáticas y técnicas utilizando controles positivos y negativos apropiados. La media y la desviación estándar de DFI obtenida para cada técnica fue: SCD: $9,48 \pm 4,82$; TUNEL: $10,35 \pm 5,36$; SCSA: $10,85 \pm 5,38$. No se encontraron diferencias estadísticas entre TUNEL, SCSA y SCD ($p = 0,093$).

El SCD test y el TUNEL consumen mucho más tiempo en comparación con el SCSA, que además obtiene resultados más exactos y precisos.

CONCLUSIONES:

Hay muchos factores que se deben considerar para seleccionar la técnica más adecuada: los costes, el tiempo, la sensibilidad y la especificidad de cada técnica. Sería necesario un mayor número de muestras con el fin de mejorar la potencia estadística. Por otra parte, las muestras patológicas se pierden en este estudio, pero estamos llevando a cabo otros estudios con estas muestras.

El uso del citómetro ofrece datos consistentes y fiables en poco tiempo, pero es una herramienta costosa. Alternativamente, el TUNEL y el SCD ofrecen resultados similares y

reproducibles, pero también muchos inconvenientes. Es por ello que el SCSA es la técnica más adecuada. Además, el potencial de la citometría de flujo parece

que solo ha hecho empezar, pudiendo evaluar variables como ROS, apoptosis, aneuploidías espermáticas, estatus mitocondrial ... lo que contribuirá en

un futuro a un nuevo seminograma mejorado.

P-089 TASAS DE IMPLANTACIÓN DE VITRIFICADOS EN D+5 Y D+6 SEGÚN LA CLASIFICACIÓN ASEBIR

E. Ferrer Robles, V. Antequera Durán, P. Muñoz Soriano, C. Calatayud Lliso, M. Ruiz Jorro
CREA. Centro Médico de Reproducción Asistida, Valencia
empar.ferrer@creavalencia.com

INTRODUCCIÓN:

El beneficio de las transferencias en estadio de blastocisto continúa siendo uno de los puntos de debate en el mundo de la reproducción humana asistida. La posibilidad de una mejor selección embrionaria, aumento en las tasas de implantación, la posible disminución de embriones aneuploides, reducción del número de embriones a transferir, mayor sincronía con el ambiente uterino, son algunos de los puntos valorados a favor del cultivo largo. Además, el perfeccionamiento que se está realizando a lo largo de los últimos años en todos los factores que intervienen en los procesos de vitrificación, tales como la composición de medios, tiempo de exposición a crioprotectores, control de las velocidades de enfriamiento y calentamiento, volúmenes mínimos de carga y mejora de los soportes, al igual que la realización de técnicas de apoyo al proceso, como el colapso del blastocelo o el hatching asistido, están permitiendo obtener tasas de supervivencia e implantación muy elevadas en blastocistos vitrificados, pudiendo así ofrecer mejores tasas acumuladas por ciclo. En el momento de la vitrificación, los blastocistos presentarán diferentes calidades, lo que teóricamente se relaciona, principalmente, con su capacidad de implantación en fresco. La clasificación de ASEBIR tiene en cuenta no solo la valoración morfológica y dinámica en este momento, sino también en estadios previos de su desarrollo.

OBJETIVOS:

El objetivo del presente estudio fue valorar la tasa de implantación de embriones vitrificados en D+5 o D+6, según su calidad, siguiendo los criterios de clasificación de Blastocistos de ASEBIR.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se incluyeron en el estudio 388 ciclos de criotransfer, con 638 blastocistos, entre D+5 y D+6, vitrificados con medios de Kitazato, con protocolo en gotas, utilizando como soportes Cryotop o Rapid-i. Previo a la vitrificación, se realizó colapso del blastocelo en blastocistos expandidos, con un sistema Láser (Saturn Active). Los embriones se clasificaron según su calidad en el momento de la vitrificación, siguiendo los criterios de ASEBIR.

Para calcular las tasas de implantación según calidad, se tuvieron en cuenta aquellos blastocistos que provenían de transferencias homogéneas (idéntica calidad) con 50% de implantación y las de 0 ó 100% de implantación, quedando un total de 492 embriones informativos.

RESULTADOS:

Las tasas globales de supervivencia, gestación clínica e implantación fueron 96,40%, 49,60%, y 39,75% respectivamente. La media de de embriones transferidos fue de 1,49 por criotransferencia. Las tasas de

implantación según la clasificación de ASEBIR e observan en la tabla 1:

tabla 1:

Gradación embrionaria D+5 - D+6	n	Tasa implantación
A	36	52,78%
B	165	41,81%
C	193	32,64%
D	98	31,63%

CONCLUSIONES:

La tasa de implantación de vitrificados en D+5 y D+6 se reduce al hacerlo la calidad de los mismos, clasificada por los criterios de ASEBIR, a excepción de la categoría D en la que no se aprecian peores tasas como sería previsible.

Una de las explicaciones de este resultado podría ser que algunos de estos blastocistos provienen de embriones multinucleados. La repercusión de la multinucleación en las tasas de implantación es una de las controversias actuales de la embriología humana.

Llama también la atención la elevada tasa de embriones clasificados como D; esto podría deberse a que algunos embriones vitrificados en D+5 presentaban evolución más lenta (mórulas) y posiblemente hubieran sido clasificados en otra categoría en caso de haber sido vitrificados en D+6.

P-090 CULTIVO DE EMBRIONES EN INCUBADOR TIME-LAPSE SIN CAMBIO DE MEDIO DESDE MICROINYECCIÓN HASTA ESTADÍO DE BLASTOCISTO.

F. Ayerdi Irizar, L. Iraurgi Izurza, Y. Galiana Briones, V. Fernandez Rodríguez, M. Ferrando Serrano, Z. Larreategui Laiseca
 IVI BILBAO, Leioa, Bizkaia
Fernando.Ayerdi@ivi.es

INTRODUCCIÓN:

El cambio de medio en las placas de cultivo es algo de uso generalizado en los laboratorios de fecundación in vitro en los estadios de cigoto y en día + 3 de desarrollo. Esta renovación de medio, asociada a una mejora en la calidad de las condiciones de cultivo, siempre se ha relacionado con un mejor desarrollo de los embriones.

OBJETIVOS:

Comprobar si el desarrollo de los embriones se ve afectado por la no renovación del medio de cultivo en el estadio de cigoto, valorando si afecta a la morfocinética y por consiguiente, a la calidad embrionaria.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se han incluido en el estudio pacientes sometidas a ciclos de ovodonación, cuyos embriones han sido cultivados en un incubador time-lapse, Embryoscope.

DÍA DEL CASO

El día de la microinyección se alicuotó un tubo con medio de cultivo a primera hora de la mañana y se introdujo en un incubador convencional (37,5°C y 6,5% CO₂) con el fin de que se equilibrara durante 2 horas. También se introdujo un tubo de aceite para que se equilibrara.

2 horas más tarde se prepararon las EmbryoSlides, utilizando el medio de cultivo y aceite previamente gaseado. Se dejaron las placas 2 horas más en el incubador para completar el equilibrio.

Tras realizar el ICSI se repartió equitativamente el número de ovocitos microinyectados en 2 placas y se

introdujeron al Embryoscope.

Se introdujo otro tubo de medio de cultivo para que se equilibrara durante la noche.

DÍA SIGUIENTE DEL CASO

Se preparó otra EmbryoSlide con el mismo método que las del día anterior.

2 horas más tarde, se pasaron los embriones de una de las placas a la nueva placa.

RESULTADOS:

El número de embriones/blastocistos de buena calidad obtenidos en ambos grupos ha sido de: 203 (64 transferidos + 139 congelados) en el grupo control vs 205 (75 transferidos + 130 congelados) en el grupo estudio.

Cuando analizamos la morfocinética embrionaria no encontramos diferencias significativas entre el grupo control y el grupo estudio (t2: 27.40 vs 27.04, t3: 37.24 vs 37.37, t4: 39.92 vs 39.95, t5: 50.66 vs 50.08, t6: 54.91 vs 54.6, t7: 58.68 vs 57.73, t8: 61.6 vs 61.23, t9: 71.98 vs 70.72, tM: 90.56 vs 91.29, tSB: 105.4 vs 106.45, tB: 108.46 vs 108.7, tEB: 117.52 vs 117.27, tHB: 122.26 vs 126.03, s2: 2.68 vs 2.58, cc2: 9.83 vs 10.33, s3: 10.93 vs 11.15, cc3: 13.42 vs 12.7). Al analizar las tasas de gestación e implantación obtenidas en ambos grupos (T.G.: 56.7% vs 61.3% y T.I.: 45.6% vs 52.2%) tampoco se observan diferencias significativas.

CONCLUSIONES:

La morfocinética y calidad de embriones en estadio de células y blastocistos, no se ve afectada por el cambio de medio en el estadio de cigoto. Según nuestro

estudio, la no renovación del medio de cultivo no parece afectar a los embriones resultantes analizados en un incubador time-lapse, Embryoscope.

A su vez, las tasas de gestación e implantación también fueron muy similares, como cabía esperar, no observándose variación de un grupo a otro.

BIBLIOGRAFÍA:

Biggers JD1, McGinnis LK, Summers MC. Discrepancies between the effects of glutamine in cultures of preimplantation mouse embryos. *Reprod Biomed Online*. 2004 Jul; 9(1):70-3.

Chatot CL1, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J Reprod Fertil*. 1989 Jul; 86(2):679-88.

Escudero E, Bosch E, Crespo J, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Comparison of two different starting multiple dose gonadotropin-releasing hormone antagonist protocols in a selected group of in vitro fertilization-embryo transfer patients. *Fertil Steril*. 2004 Mar; 81(3):562-6.

García-Velasco JA, Bermejo A, Ruiz F, Martínez-Salazar J, Requena A, Pellicer A. Cycle scheduling with oral contraceptive pills in the GnRH antagonist protocol vs the long protocol: a randomized, controlled trial. *Fertil Steril*. 2011 Sep; 96(3):590-3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.06.022. Epub 2011 Jun 30.

Whitten WK, Biggers JD. Complete development in vitro of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. *J Reprod Fertil*. 1968 Nov; 17(2):399-401.

P-091 ANALISIS COMPARATIVO ENTRE GTL Y G1-G2 EN EMBRYOSCOPE: CULTIVO ININTERRUMPIDO VS. SECUENCIAL

N. Landaburu Mari, G. Capllonch Amer, O. Ruiz Guerrero, S. Bohórquez Borrego, A. Múgica De la Iglesia, A. Calderón Aizpitarte, A. Serra Peruchet, M. Torres Vives, J. Marqueta Sobrino.
IBILAB; Palma de Mallorca, Illes Balears
laboratorioibi@ibilab.com

INTRODUCCIÓN:

La mejora en las tasas de resultados obtenidos mediante tecnología time-lapse aplicada al cultivo embrionario puede deberse a dos factores complementarios. Por un lado se obtiene gran cantidad de información que puede ayudar a mejorar los criterios de selección embrionaria. Sin embargo, es muy importante no generalizar respecto a estos criterios y deben confeccionarse algoritmos personalizados para cada laboratorio.

Por otro lado, la tecnología time-lapse permite evitar la manipulación de los embriones para su observación, manteniendo unas condiciones estables en su cultivo. Recientes estudios hipotetizan que es este último factor el que puede influir positivamente sobre los resultados obtenidos, minimizando el efecto de la selección embrionaria mediante parámetros morfocinéticos. Para maximizar la no manipulación de embriones se han desarrollado medios de cultivo one-step, que aportan los componentes necesarios para el desarrollo hasta estadio de blastocisto del embrión. En contraposición, se encuentran los secuenciales, que diferencian los aportes necesarios desde D+0 hasta D+3 y desde la activación del genoma embrionario hasta D+6.

OBJETIVOS:

- Validar la estrategia de cultivo embrionario ininterrumpido con medio GTL (Vitrolife) y transferencia en D+5.
- Comparar la estrategia de cultivo ininterrumpido respecto al cultivo con medios secuenciales, de G1 a G2, en D+3 (Vitrolife).

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se analizaron retrospectivamente los tratamientos realizados mediante time-lapse durante 2014. Por un lado, un grupo de 21 pacientes sometidas a un tratamiento de FIV-ICSI (en función de calidad seminal) con óvulos donados y con cultivo hasta D+5 ininterrumpido. Como grupo control se tomaron 16 pacientes, también sometidas a tratamientos de FIV-ICSI con óvulos donados usando G1 como medio de cultivo en Embryoscope, cambiando los embriones a medio G2 en D+3, por lo que el cultivo hasta D5 queda interrumpido. En todos los casos se transfirieron 1 o 2 embriones en D+5. Se calcularon la tasa de embarazo clínico, número de ovocitos donados, número de embriones obtenidos. Se consideró embarazo clínico la observación de saco embrionario con latido. Se valoró la calidad según clasificación ASEBIR y el número de mórulas, embriones cavitando, blastocistos tempranos y blastocistos expandidos.

Para el análisis estadístico se realizó un test de X², test T- Student y U Mann-Whitney.

RESULTADOS:

No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados.

CONCLUSIONES:

La implementación de una nueva estrategia de cultivo embrionario que implica un cambio de un medio secuencial por uno del tipo one-step requiere de la validación de la eficacia de la misma. Este trabajo pretende valorar el efecto positivo que tiene el hecho de minimizar los cambios en las condiciones de cultivo de los embriones.

En todos los parámetros analizados se obtuvieron valores no significativos de una estrategia respecto a la otra. Sin embargo hay que tener en cuenta otros factores como es económico (el cambio de medios y placa aumenta el precio total del ciclo) y de economización de tiempo del embriólogo.

Deberían realizarse estudios prospectivos randomizados más extensos para confirmar que la tendencia que se observa en este estudio se confirma.

	G-TL	G1-G2	
Tasa embarazo	81,25	80,95	p>0.05
Embriones obtenidos	12,19 ± 2,76	11,00 ± 3,39	p>0.05
Blastocistos vitrificados	8,69 ± 2,52	8,33 ± 2,44	p>0.05
Embriones tipo A	2,69 ± 1,62	2,00 ± 2,28	p>0.05
Embriones tipo B	2,44 ± 1,59	2,48 ± 2,11	p>0.05
Embriones tipo C	1,88 ± 1,09	2,24 ± 1,87	p>0.05
Embriones tipo D	1,69 ± 1,01	1,48 ± 1,33	p>0.05
Mórula	1,63 ± 1,50	0,81 ± 0,87	p>0.05
Cavitando	0,13 ± 0,34	0,19 ± 0,51	p>0.05
Blastocisto temprano	0,69 ± 0,79	0,57 ± 1,03	p>0.05
Blastocisto expandido	1,00 ± 0,97	0,52 ± 0,75	p>0.05

BIBLIOGRAFÍA:

(1) Kaser DJ, Racowsky C. Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review. Hum Reprod Update.

2014 Sep-Oct;20(5):617-31. doi: 10.1093/humupd/dmu023. Epub 2014 Jun 2.

(2) Basile N1, Caiazzo M, Meseguer M. What does morphokinetics add to embryo selection and in-vitro fertilization

outcomes? Curr Opin Obstet Gynecol. 2015 Jun;27(3):193-200. doi: 10.1097/GCO.0000000000000166.

P-092 IMPLANTACIÓN DEL SISTEMA TIME-LAPSE EEVA Y PARÁMETROS CLÍNICOS

C. Roméu Périz, M. Lierta Sancho, A. Chueca Villanueva, C. de Bonrosto Torralba, I. Giménez Blasco, A. Urries López
Hospital Quirón Salud Zaragoza, Unidad de Reproducción Asistida, Zaragoza
cromeu.zar@quiron.es

INTRODUCCIÓN:

El uso extensivo de los sistemas time-lapse ha sido uno de los últimos avances en el campo de la reproducción asistida actual. Si bien es cierto que todos aportan una gran cantidad de información sobre la morfofocinética del embrión, el sistema EEVA (Early Embryo Viability Assessment) es el único que ofrece una clasificación final, objetiva y automatizada de los embriones observados.

OBJETIVOS:

Analizar la tasa de embarazo, implantación y aborto en función de si se ha utilizado únicamente categorización morfológica en la evaluación embrionaria o morfología más sistema de visionado time-lapse. Comparar la tasa de implantación en función de la clasificación aportada por el sistema EEVA.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se analizaron un total de 497 transferencias realizadas entre enero de 2014 y mayo de 2015. En 150 de ellas se combinó categorización morfológica+EEVA: 126 transferencias con ovocitos que provenían de la propia paciente (OVOPROP); edad 35,79+4 años (media+DS) y 24 transferencias con ovocitos de donante (OVODON); edad 26,50+4 años (media+DS). El resultado final del EEVA se traduce como probabilidad del embrión en D+3 de evolucionar a Blasto y se define

así: Alta (H), Media (M) o Baja (L). Parámetros analizados: % global de embarazo/transferencia, % global de implantación/transferencia, % implantación de embriones H, M y L por transferencia y % aborto de embriones H frente a embriones categoría A. Se utilizó el test U de Mann-Whitney para hallar las diferencias entre los distintos grupos.

a la de los embriones M y L que fue 33,34% y 30,23% respectivamente. Los embriones M y L mostraron unos % implantación muy similares entre ellos, tanto de forma global como cuando se comparó según el origen de los ovocitos, por lo que ambos grupos se unificaron, formando el conjunto: M+L (Tabla 1).

	CLASIFICACIÓN EEVA	
	HIGH (H)	MEDIUM + LOW (M+L)
OVOPROP	39,13 ^b	29,21 ^c
OVODON	56,00 ^b	62,50 ^c
TOTAL	42,14 ^a	31,96 ^a

Tabla 1. Porcentaje de implantación por transferencia en función de la clasificación EEVA y de la procedencia de los ovocitos. Se representa el porcentaje (%) y los valores estadísticamente significativos, ^a P<0,05, ^{b,c} P<0,005. OVOPROP (embriones procedentes de ovocitos de la propia paciente; n=126 transferencias) y OVODON (embriones procedentes de ovocitos de donante; n=24 transferencias).

RESULTADOS:

Cuando para seleccionar los embriones a transferir se utilizó morfología+EEVA frente a sólo morfología se observó cómo aumentaba tanto la tasa global de embarazo (58,52% vs. 52,92%) como la de implantación (37,97% vs. 35,37%). Respecto a la clasificación EEVA, los embriones H presentaron un % implantación de 42,14%, significativamente superior (P<0,05)

Por un lado y dentro de cada grupo (H y M+L), cuando se comparó el % implantación entre OVOPROP y OVODON siempre fue significativamente superior el alcanzado por los embriones procedentes de OVODON (P<0,005). Por otro lado, al comparar el % implantación entre embriones H y embriones M+L según el origen de los ovocitos, el porcentaje fue superior en embriones H-

OVOPROP frente a embriones M+L-OVOPROP y, sorprendentemente inferior en H-OVODON frente M+L-OVODON. El % aborto de embriones H fue 12,50%, dato significativamente inferior ($P < 0,05$) al obtenido por embriones categoría A (no sometidos a evaluación time-lapse).

CONCLUSIONES:

La utilización del sistema time-lapse EEVA junto con la categorización morfológica genera un aumento no solo de la tasa de embarazo/transfere

sino también del porcentaje de implantación/transfere

biológica del ovocito como a la capacidad receptiva del endometrio.

Que los embriones Médium+Low de óvulos de donante presenten una mayor tasa de implantación respecto a los embriones de óvulos de donante High puede ser debido al tamaño muestral. En resumen y aunque es necesario un mayor número de estudios para confirmar dichos resultados, el uso de la selección embrionaria mediante morfología+EEVA parece aumentar la tasa de embarazo e implantación y disminuir los porcentajes de aborto.

P-093 ¿QUÉ PASA CON LOS EMBRIONES CLASIFICADOS COMO D EN D+5 O D+6? ¿VALE LA PENA VITRIFICARLOS?

E. Ferrer Robles, P. Muñoz Soriano, V. Antequera Durán, C. Calatayud Lliso, M. Ruiz Jorro
CREA. Centro médico de Reproducción Asistida, Valencia
empar.ferrer@creavalencia.com

INTRODUCCIÓN:

El grupo de embriones clasificados por ASEBIR como D son aquellos que tienen un bajo potencial de implantación, tanto en la clasificación en estadio de células como en la de en D+5 o D+6. Esta está relacionada con dos tipos diferentes de embriones, aquellos que llevan una evolución con mal pronóstico (simetría celular, fragmentación, división celular...) y con los multinucleados. Los embriones clasificados como D según la presencia de multinucleación en las primeras divisiones del embrión y su repercusión en cuanto a capacidad de implantación y desarrollo evolutivo, es un hecho controvertido. La aparición de la tecnología Time-Lapse ha aportado más información sobre la cinética y evolución morfológica y podría ocurrir que la multinucleación fuera un hecho fisiológico o habitual en el embrión humano.

En este estudio queremos valorar la eficacia y resultados de la vitrificación de embriones D, bien sean por su mal desarrollo o por ser multinucleados.

OBJETIVOS:

El primer objetivo del presente estudio es valorar las tasas de implantación y la posterior evolución de estos sacos (evolutivos, detenidos/abortados o ectópicos), correspondientes a transferencias de embriones clasificados como D en D+5 o D+6 según el criterio ASEBIR.

El segundo objetivo fue, "reclasificando" a los embriones teniendo en cuenta tan solo su morfología en D+5 y D+6 (sin tener en cuenta su evolución embrionaria) valorar igualmente las tasas de implantación y la posterior evolución. También se valoraron los resultados si provenían de embriones multinucleados.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se incluyeron en el estudio 98 embriones clasificados como D en D+5 ó D+6 según criterios ASEBIR, provenientes de ciclos de criotransfer, vitrificados con medios de Kitazato, con protocolo en gotas, utilizando como soporte el Cryotop y Rapid-i. Se realizó previo a la vitrificación, el colapso del blastocelo a las blastocistos expandidos, con un sistema láser (Saturn Active). Estos embriones se

podieron incluir en el estudio porque conocíamos su capacidad implantatoria, es decir que solo se tuvieron en cuenta aquellos que provenían de transferencias homogéneas con el 50% de implantación, y las de 0 ó 100% de implantación.

RESULTADOS:

Estudio primero: De los 98 embriones clasificados como D se obtuvo una tasa de implantación del 31,63%, siendo la evolución de estos sacos la siguiente: 83,87% evolutivos, 12,9% detenidos/abortados y 3,23% de ectópicos.

Estudio segundo: valorando tan solo la morfología en D+5 o D+6 (de la clasificación de ASEBIR) y su multinucleación; los resultados se indican en la tabla 1:

Tabla 1:

CONCLUSIONES:

La vitrificación de embriones clasificados como D nos ofrece unas buenas tasas de implantación y bajas tasas de sacos abortados. Permitiendo ser una técnica segura y eficaz.

Clasificación morfológica D+5-D+6	n total	implantados	Tasa implantación	Sacos evolutivos	% sacos evolutivos	Sacos detenidos	% Sacos detenidos	Ectópicos	% Ectópicos
A	2	0	0%	-	-	-	-	-	-
A mn	1	0	0%	-	-	-	-	-	-
B	29	16	55,17%	11	68,75%	4	25%	1	6,25%
B mn	17	10	58,82%	8	80%	1	10%	1	10%
C	35	10	28,86%	10	100%	0	0%	0	0%
C mn	13	4	30,77%	4	100%	0	0%	0	0%
D	32	6	19%	6	100%	0	0%	0	0%
D mn	3	0	0%	-	-	-	-	-	-

Los resultados nos indican que aquellos embriones que alcanzan la morfología correcta de blastocisto, (grado de

expansión del blastocelo, MCI y TE), a pesar de que vengan de embriones multinucleados, presentan buenas tasas

de implantación y posterior evolución. ASEBIR actualmente está valorando el recalificar estos embriones.

P-094 CONOCIMIENTO ACTUAL DE LA POBLACIÓN GENERAL SOBRE LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

V. Castañón Bernardo, L. Sánchez Castro, P. Llana Coto, P. Martínez-Cambor, M. Méndez López, E. Fernández Fernández, J. Álvarez Pérez, M. Torrents Muns.
Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Principado de Asturias
biovaneb@hotmail.com

INTRODUCCIÓN:

La medicina reproductiva ha saltado desde un marco científico a uno social. Se conoce la influencia de la edad sobre los resultados de las técnicas de reproducción asistida (TRA) y el papel del estilo de vida en su éxito.

No existen muchos estudios de los conocimientos de la población sobre las TRA. Nuestra impresión es que son escasos y que es necesaria más educación sanitaria.

OBJETIVOS:

- Describir el nivel de conocimiento sobre TRA de una población.
- Evaluar la diferencia de conocimientos según factores sociodemográficos.
- Estimar la edad óptima para ser padre según nuestro grupo de estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Hemos diseñado la siguiente encuesta con 10 ítems mediante la plataforma "surveyMonkey". Se distribuyó con la ayuda de whatsapp, correo electrónico, facebook y twitter.

1. Edad
2. Sexo
3. Estudios
4. Hábitos de vida
5. ¿Tiene hijos o le gustaría tenerlos?
6. ¿A qué edad le gustaría ser padre/madre?
7. ¿Piensa que hay alguna edad a la que la fertilidad se ve reducida?
8. ¿Ha oído hablar de los TRA? ¿Piensa que son un servicio del SNS?
9. Marque las técnicas de las que haya oído hablar ¿sabría explicar básicamente en qué consisten?

- Inseminación artificial (IA).
- Fecundación in vitro (FIV).

- ICSI.

- Diagnóstico genético preimplantacional.

- Donación de ovocitos.

- Preservación de la fertilidad.

Según el número de técnicas conocidas y las respuestas 7,8 y 10 se elaboró un score con el número de aciertos (máximo 9).

10. ¿Cuál cree que es la tasa de recién nacido sano en las TRA?

RESULTADOS:

88 personas respondieron (30% hombres). Edad media: 38 años, 57,47% titulados superiores.

Al 45,45% le gustaría tener hijos y aún no los tiene y la edad global deseable para ser padre es 33.

Un 41,86% piensa que la fertilidad decrece en ambos sexos a partir de cierta edad, pero un 29% piensan que no hay límite en el hombre.

Todos han escuchado hablar de TRA pero un 19,54% piensan que solo se realizan en centros privados.

En cuanto a técnicas, casi todos conocen la IA y la FIV mientras que solo el 15% han oído hablar de ICSI o DGP, la preservación de fertilidad es más popular (29,55%) y la donación de ovocitos aún más (56,8%).

Referente a las expectativas de éxito, un 36,36% consideraban la tasa de recién nacido vivo > 60%. Las respuestas aquí estaban repartidas entre distintas opciones, incluso 5 encuestados creían que este valor es del 100%.

El score medio fue bajo: 4,30. No se encontraron diferencias según género (4,48 mujeres vs 3,88 hombres, p-valor 0,180), tampoco según nivel académico

(discreto aumento sanitarios: 5,43). Ser padre no se relacionó con un mayor conocimiento (p valor 0,541).

La edad óptima para ser padre era de 30 años en quienes ya habían pasado dicha experiencia, 35 si deseaban serlo y 38 si no tenían intención de serlo.

Es curioso como esta edad aumentaba con el nivel de estudios (28,8 personal sanitario, 30,3 estudios primarios, 33,14 secundarios y 34,95 superiores) y con la edad actual; dando la impresión de una "adaptación" a las circunstancias.

Limitaciones: difusión a partir de una primera persona personal sanitario. Al ser voluntario y anónimo, puede que las personas más interesadas sean las que responden.

Nos parece interesante ampliar el estudio en diferentes grupos.

CONCLUSIONES:

- El conocimiento sobre TRA de la población general es bajo.
- No encontramos ningún factor asociado a mayor conocimiento.
- La edad deseable para ser padres aumenta con la edad y con el nivel académico.
- Sería muy interesante una mayor difusión sobre las TRA en la población general.

BIBLIOGRAFÍA:

J.C. Daniluk, E. Koert. Fertility awareness online: the efficacy of a fertility education website in increasing knowledge and changing fertility beliefs Hum. Reprod. (2015) 30 (2): 353-363.

M. McLean, M.F. Wellons. Optimizing Natural Fertility. The Role of Lifestyle Modification. Obstet Gynecol Clin N Am 39 (2012) 465-477.

P-095 ¿AFECTAN LOS NIVELES DE PROGESTERONA EL DÍA DE LA HCG A LOS RESULTADOS DE LAS TRANSFERENCIAS EN FRESCO?

S. García Oro, I. Rey Daluz, M. Rodríguez Alonso, E. Guerra García, F. López-Roibal Mourelle, A. Durán Boo, R. Devesa Hermida
Hospital Quirón A Coruña, A Coruña
sabela.oro@quiron.es

INTRODUCCIÓN:

La elevación de los niveles de Progesterona (P4) el día de la administración de la hCG ha sido relacionada por algunos autores con menores tasas de embarazo e implantación. Se cree que el origen de este fenómeno puede ser el exceso de progesterona producido por las células de la granulosa que han comenzado la luteinización, lo que se conoce como Luteinización Precoz.

OBJETIVOS:

Las diferentes tasas de embarazo observadas tras las transferencias de embriones en fresco y embriones

vitrificados de un mismo ciclo en numerosas pacientes de nuestra Unidad nos han llevado a pensar en la existencia de algún factor externo a la propia calidad embrionaria que estaría afectando a nuestros resultados. Con esta evidencia, nuestro objetivo es comprobar si los resultados de las transferencias en fresco pueden estar afectados por valores elevados de P4.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo realizado entre enero y septiembre del año 2014.

A todas las pacientes que se realizan punción folicular entre estas fechas se les solicita P4 el día de la administración

de la hCG. Independientemente del valor obtenido se realiza la transferencia embrionaria.

Posteriormente se evalúan los resultados con un análisis de dispersión, se establece un punto de corte y se calcula su significación estadística.

RESULTADOS:

53 pacientes con ovocitos propios a las que se les ha realizado transferencia embrionaria en fresco. Con los resultados de P4 obtenidos y el resultado de embarazo se estableció un punto de corte para P4 de 0.8.

Transferencias P4 < 0.8 (n: 35, edad media: 38.3, embriones transferidos: 1.46, embarazo clínico: 60%). Transferencias P4 > 0.8 (n: 18, edad media: 38.8, embriones transferidos: 1.61, embarazo clínico: 16.6%). Las diferencias obtenidas son estadísticamente significativas (p: 0,0026).

Como dato de interés, 6 de 7 pacientes del grupo de P4 > 0.8 que no se han quedado embarazadas tras la transferencia en fresco, se han quedado embarazadas tras la primera transferencia de embriones vitrificados.

Las 8 restantes no tenían embriones vitrificados.

CONCLUSIONES:

En nuestra unidad es de gran utilidad el valor de la P4 el día de la administración de la hCG.

Tras los resultados obtenidos y sabiendo que en nuestro laboratorio contamos con un buen programa de criopreservación embrionaria, se ha decidido diferir la transferencia a aquellas pacientes cuyos valores de P4 superen el punto de corte establecido (0.8). Con esta nueva estrategia hemos optimizado los resultados, sobre todo en pacientes con pocos embriones que no van a tener más de una transferencia.

BIBLIOGRAFÍA:

Aboubakr M. Elnashar. Progesterone rise on the day of HCG administration (premature luteinization) in IVF: An overdue update. *J Assist Reprod Genet* (2010) 27:149–155.

Hofmann GE, Bentzien F, Bergh PA, et al. Premature luteinization in controlled ovarian hyperstimulation has no adverse effect on oocyte and embryo quality. *Fertil Steril*. 1993;60:675–9.

Venetis C, Kolibianakis E, Papanikolaou E, Bontis J, Devroey P, Tarlatzis B. Is progesterone elevation on the day of human chorionic gonadotrophin administration associated with the probability of pregnancy in in vitro fertilization? A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2007;13:343–55.

P-096 ¿PODEMOS IDENTIFICAR BLASTOCISTOS DE BUENA CALIDAD SIN TENER UN TIME-LAPSE?

S. Cortes Gallego, A. Guijarro Ponce, L. Ortega Lopez, C.L. Luna Cañas, E. Olaya Vila, B. Rodriguez Alonso, P. Caballero Peregrin, R. Núñez Calonge
Clínica Tambre, Madrid
lortega@clincatambre.com

INTRODUCCIÓN:

Hoy en día sabemos que el cultivo largo mejora las tasas de implantación, debido a la mayor selección de los embriones transferidos y a la optimización de la sincronía con el útero. Sin embargo, un inconveniente importante y conocido de los cultivos largos es la posible no transferencia de embriones en día 5 debido a la no evolución de los embriones a estadio de blastocisto.

En la actualidad la mayoría de los estudios para mejorar la selección embrionaria se basan en sistemas de time-lapse, aunque su coste económico sea elevado. Para algunas clínicas estos sistemas no son accesibles debido a este coste, por ello surge la necesidad de elaborar una mejora en la técnica de

selección de embriones sin necesidad de equipos de time-lapse.

OBJETIVOS:

El objetivo de este estudio fue desarrollar un sistema no invasivo, que nos prediga el cálculo de formación de blastocistos de buena calidad mediante un modelo estadístico basado en la morfología del embrión tradicional en el día 3 de cultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio prospectivo realizado en la Clínica Tambre entre enero y noviembre de 2014. La evaluación de los embriones desde día 3 a día 5 se realizó en 106 parejas, en un total de 786 embriones. Del total de embriones, 138 embriones

procedían de gametos propios y 648 embriones procedían de ciclos con ovocitos donados. De cada embrión se valoró el número de células y la tasa de fragmentación en el día 3, así como la calidad de los blastocistos en día 5 según la clasificación de Lucinda Veeck.

Se realizó un análisis de regresión logística binaria multivariable para determinar las variables relacionadas con los blastocistos de buena calidad.

RESULTADOS:

Embriones de buena calidad (grados 1 y 2) con un mínimo de 8 células en día 3 (54% del total) se podrían considerar de pronóstico favorable para alcanzar el estadio de blastocisto (OR : 2,97 , IC95 % : 2,41-3,67 . p < 0,001 , sensibilidad:

69,8% y una especificidad : 71,3%), así como el logro de una buena calidad de blastocisto (OR : 1,69 ; IC : . 1,53-1,88 p < 0.001 , la sensibilidad : 58 , 6 % y una especificidad : 81,1 %).

Determinar el número de células y porcentaje de fragmentación son los dos únicos parámetros que independientemente, representan un valor pronóstico respecto a la probabilidad de que el embrión alcance el estadio de blastocisto y de la calidad del mismo.

Debemos tener en cuenta para embriones de día 3 con calidades

intermedias el número de células ya que el porcentaje de formación de blastocisto en embriones de calidad 3-4 con más de 7 células es de un 71.4 % frente a un 80.4 % de embriones con grados 1-2.

CONCLUSIONES:

Este enfoque es una herramienta prometedora para la predicción de formación de blastocistos y podría ser útil para reducir el número de ciclos que se quedan sin transferencia.

Los pacientes con una baja probabilidad de desarrollo de blastocisto podrían ser

aconsejados a someterse a transferencia de embriones en día 3 y los que tienen la mayor probabilidad de desarrollo de blastocisto podrían ser animados a continuar a cultivo largo y realizar transferencia de un solo embrión en día 5.

Necesitamos más datos que nos garanticen si los embriones seleccionados por este análisis son capaces de llevar un embarazo a término.

P-097 ASOCIACIÓN CUALITATIVA ENTRE CRITERIOS MORFOLÓGICOS ESTANDARIZADOS Y FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

M. Moyano Ortega (1), P. González Gómez (1), M. Toledano Rus (1), F. González Gómez (1), A. González Medina (2), F. Vergara Alcaide (2)
(1) UR HOSPITAL INMACULADA, Granada (2) CRIOVIDA SLP, Granada
carmenmyot@hotmail.com

INTRODUCCIÓN:

La calidad del genoma espermático es un factor que influye de manera notable en la embriogénesis temprana.

La correlación fragmentación de ADN y parámetros morfológicos de selección de espermatozoides es todavía un campo abierto a la investigación.

Nuestro principal objetivo en esta investigación es ver si existe una correlación entre la aplicación de nuestros criterios morfológicos en la selección espermática en ICSI y el nivel de fragmentación del ADN espermático. Con esta finalidad, separamos manualmente dos grupos de 2000 espermatozoides cada uno a partir de una muestra inicial normozoospermica. La muestra cumplía los criterios estrictos de Kruger y no se le realizó al fresco test de fragmentación espermática por no cumplir nuestros criterios (>14% vacuolados).

OBJETIVOS:

La fragmentación de ADN espermático como indicador de calidad seminal se ha convertido recientemente en un área de interés.

Las diferentes tecnologías que se han aplicado han llegado a la misma conclusión: dicha fragmentación se correlaciona con altas tasas de infertilidad (Kodama et al., 1997; Henkel et al., 2004).

El objetivo del presente estudio es demostrar si existe una correlación entre los criterios morfológicos de selección en ICSI y el grado de fragmentación del ADN.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Muestra de partida normozoospermica.

Valoramos morfología con criterios estrictos de Kruger.

Seleccionamos unos 2000 espermatozoides, los cuales cumplían los criterios morfológicos que usamos en nuestro centro como aptos para microinyectar, siendo transferidos posteriormente mediante aguja (Humagen)® de microinyección desde una gota de PVP (COOK)® hacia una gota de Sperm Washing (Sage®). Hacemos lo mismo con otros 2000 espermatozoides, ahora al azar. Aplicamos el test de fragmentación de ADN Halosperm® a ambas alícuotas de la muestra inicial analizando 200 espermatozoides por muestra.

RESULTADOS:

Los resultados fueron analizados con el paquete estadístico UNStat 2.0.

Existen diferencias significativas entre la alícuota seleccionada al azar a partir de la muestra y la que seleccionamos a partir de los criterios morfológicos estrictos (Tabla I) (Tabla II).

OBS	Fragment.	No fragment,	Total
Control	61	139	200
Selección	14	186	200
Total	75	325	400

Pruebas de contingencia					
	Estadísticos Chi ²			Sig. exacta	
	Valor	gl	Sig. asint.	2 colas	1 cola
Chi-cuadrado Pearson	36,2503	1	0,000		
Con corrección de Yates	34,7241	1	0,000		
G	38,5899	1	0,000		
Prueba exacta (<i>mid-p</i>)				0,000	0,000
Prueba exacta de Fisher				0,000	0,000
Min. frecuencia esperada	37,50				

Se puede concluir que la aplicación de unos criterios morfológicos estrictos favorecen una disminución considerable de la probabilidad de seleccionar un espermatozoide con ADN fragmentado en una muestra normozoospermica (Figura I).

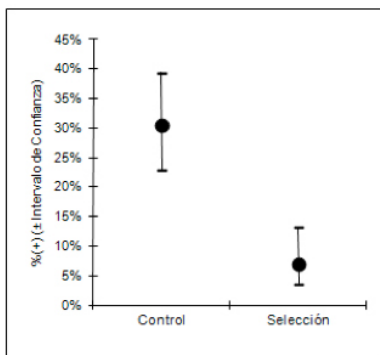


Figura I

CONCLUSIONES:

Creemos que los criterios morfológicos que empleamos en una microinyección espermática nos ayudan a disminuir el riesgo de utilizar espermatozoides con el ADN fragmentado en determinados tipos de muestras.

Pensamos que este tipo de estudio se podría extender a otros tipos de muestras patológicas, tales como oligo, asteno y teratospérmicas y que podría servir para desarrollar un control que nos indique si las condiciones que se dan a nivel de microscopía en el laboratorio (definición, amplitud de la imagen, características morfométricas) y los criterios morfológicos empleados son óptimas para la disminución del riesgo que supone la introducción de espermatozoides con ADN fragmentado.

Pensamos que este estudio puede ser el punto de partida para otros análisis más ambiciosos.

BIBLIOGRAFÍA:

- * Evenson D, Larson K, Jost LK et al. (2002) Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparison with other techniques. J Androl 23: 25-43.
- * Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T et al. (2004) Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. Fertil Steril 81: 965-972.
- * Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J et al. (1997) Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. Fertil Steril 68: 519-524.

P-098 IMSI CON MUESTRAS CONGELADAS OAT Y ÓVULOS DE DONANTE: AUMENTO DE LAS TASAS DE IMPLANTACIÓN Y EMBARAZO A TÉRMINO

C. Urda Muñoz, V. Badajoz Liébana, T. Sánchez Arenas, A. Díaz Corujo, S. Camacho Fernandez-Pachecho, JA. Gragera Segura, L. Martínez De la Cruz, M. de la Casa Heras, MC. Cañadas Galvez, M. Oter
GINEFIV, Madrid
c.urda@ginefiv.com

INTRODUCCIÓN:

El método MSOME (del inglés motile sperm organelar morphology examination) se ha presentado como la mejor herramienta para seleccionar espermatozoides y para visualizar las vacuolas del núcleo espermático [1]. Se ha documentado un incremento de cromatina descondensada, la cual es más vulnerable a sufrir daños, en espermatozoides con vacuolas grandes [2]. Recientemente, un estudio ha mostrado que la congelación de semen en pacientes infértiles disminuye de manera significativa el porcentaje de espermatozoides de buen pronóstico en la muestra y puede aumentar el número de espermatozoides con cromatina descondensada. Con lo cual, se ha sugerido que la metodología del MSOME sería la mejor herramienta para evaluar muestras de semen congelado [3].

De la unión del MSOME y la ya conocida ICSI surgió la IMSI (del inglés intracytoplasmic morphologically select sperm injection), que podría ser la mejor opción para pacientes que tienen que usar muestras congeladas para el proceso de microinyección espermática.

OBJETIVOS:

Comparar los resultados clínicos obtenidos en función de la técnica empleada para la selección de espermatozoides destinados a realizar la microinyección espermática: IMSI o ICSI. El objetivo se llevará a cabo en una población de pacientes receptoras de óvulos con muestras congeladas oligoastenoteratozoospermicas (OAT).

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se estudiaron de forma retrospectiva 150 ciclos de ovodonación llevados a cabo en nuestro centro en el año 2011. En 91 ciclos se realizó IMSI, y en 59 ICSI. Las muestras seminales fueron analizadas siguiendo las recomendaciones de las OMS 1999. Se realizó un estudio comparativo de los resultados clínicos (tasa de fecundación e implantación, calidades embrionarias, gestación clínica, aborto y embarazo a término), en función del tipo de técnica usada para realizar la microinyección, IMSI o ICSI.

RESULTADOS:

En nuestro estudio estadístico encontramos diferencias significativas que posicionan a la IMSI como el mejor método cuando trabajamos con muestras congeladas OAT. Ante parámetros seminales y condiciones del ciclo similares, la tasa de implantación (IMSI: 26.37 ± 36.00 ; ICSI: 14.40 ± 29.43), la gestación clínica (IMSI: 38.5%; ICSI: 15.3%) y el embarazo a término (IMSI: 33%; ICSI: 13.6%), mostraron diferencias significativas a favor de la IMSI ($p < 0.05$). Sin embargo, no encontramos beneficios ni en la tasa de fecundación, ni en las calidades embrionarias, ni en el porcentaje de aborto.

CONCLUSIONES:

Según nuestros resultados, consideramos que la realización de IMSI ha permitido excluir de la microinyección a espermatozoides

con alta vacuolización, haciendo que las tasas de implantación y el porcentaje de nacimientos aumenten considerablemente. Con lo cual, teniendo en cuenta la necesidad de tener que congelar el semen por motivos diversos cuando los pacientes se someten a un ciclo de reproducción asistida, creemos que la mejor opción es dirigir a estos pacientes a un ciclo de IMSI.

Concluimos, que la introducción de la IMSI en nuestro laboratorio ha aumentado la eficacia de la tecnología de la reproducción en esta población de pacientes receptoras de óvulos con muestras OAT criopreservadas.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Berkovitz, A., et al., Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? *Hum Reprod*, 2006a. 21(7): p. 1787-90.
2. Franco, J.G., Jr., et al., Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. *Reprod Biomed Online*, 2008. 17(1): p. 42-5.
3. Boitrelle, F., et al., Cryopreservation of human spermatozoa decreases the number of motile normal spermatozoa, induces nuclear vacuolization and chromatin decondensation. *J Androl*, 2012. 33(6): p. 1371-8.

P-099 ¿DEBERIAMOS INCLUIR EL TEST DE FRAGMENTACION COMO PRUEBA DE RUTINA?

T. Sánchez Arenas, V. Badajoz Liébana, M. De la Casa Heras, J. Gijón De la Santa, C. Pérez Ortiz, C. Urda Muñoz, O. López Benítez, M. Alcaraz Pérez, MC. Cañadas Gálvez, J. Rodríguez Mesa
GINEFIV, Madrid
t.sanchez@ginefiv.com

INTRODUCCIÓN:

El éxito de los tratamientos de reproducción asistida depende de muchos factores, entre ellos la integridad genética de los gametos (1, 2). En los últimos años se han desarrollado distintas técnicas fácilmente aplicables en cualquier laboratorio, relacionadas con el daño en el DNA del espermatozoide, permitiendo su estudio más profundo (3, 4). Se ha demostrado que muestras seminales con niveles superiores al 30% de fragmentación en el DNA, están asociadas con una disminución de las tasas de fecundación o implantación pudiendo dar lugar a mala calidad embrionaria o abortos (3, 5, 6). El análisis del índice de fragmentación del DNA espermático (IF) de forma rutinaria, podría suponer una aportación adicional en el estudio seminal del varón.

OBJETIVOS:

El objetivo de este estudio fue valorar si hay una mayor población de pacientes con fragmentación del DNA espermático patológico (IF >30%) cuando hay una indicación previa, con respecto a la población general de parejas infértiles. Asimismo, evaluamos también si existe alguna relación entre la calidad espermática y el IF entre ambos grupos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Hemos realizado un estudio prospectivo durante el año 2014 en el que se estudió el IF y el seminograma básico de 177 pacientes con al menos dos ciclos

de FIV/ICSI fallidos y/o abortos de repetición (Grupo I: con indicación) y, 209 pacientes que acudieron a nuestro centro con problemas de fertilidad sin haber realizado ningún tratamiento de reproducción asistida previo (Grupo II: sin indicación). En el Grupo I se utilizó como criterio de exclusión la edad materna superior a 38 años y/o patologías ginecológicas conocidas. En ambos grupos, se analizó el IF mediante la técnica de SCD (Halosperm®). El diagnóstico de las muestras se hizo siguiendo los valores de referencia establecidos por el manual de la OMS 2010. El programa estadístico utilizado fue SPSS 15.0®.

RESULTADOS:

No se encontraron diferencias significativas en el número de pacientes con IF > 30% entre los dos grupos de estudio (Grupo I: IF >30%: 80.22%; IF <30%: 19.78%; Grupo II: IF <30%: 83.33%; IF >30%: 16.67%). Sin embargo, si se observó un mayor IF en los pacientes con fragmentación >30% en el Grupo I, siendo éste estadísticamente significativo (Grupo I: 44,37%; Grupo II: 38,26%; p<0.05).

No encontramos diferencias significativas en relación a la calidad espermática y el IF entre ambos grupos de estudio.

CONCLUSIONES:

Debido a que, la población de pacientes con el IF >30% en nuestro estudio fue similar en ambos grupos, se puede establecer que, el análisis de la

fragmentación del DNA espermático es un valor pronóstico importante de cara al inicio de un tratamiento de reproducción asistida en varones infértiles, al igual que un seminograma básico.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Matorras, R.H., J., *Estudio y Tratamiento de la Pareja Estéril*. 1ª Edición. Madrid Adalia Farma S.L, 2007.
2. Larson, K.L., et al., Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod*, 2000. 15(8): p. 1717-22.
3. Fernandez, J.L., et al., The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl*, 2003. 24(1): p. 59-66.
4. Tesarik, J., Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. *Reprod Biomed Online*, 2005. 10(3): p. 370-5.
5. Tesarik, J., E. Greco, and C. Mendoza, Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod*, 2004. 19(3): p. 611-5.
6. Mangiarini, A., et al., Specific sperm defects are differentially correlated with DNA fragmentation in both normozoospermic and teratozoospermic subjects. *Andrology*, 2013. 1(6): p. 838-44.

P-100 RELACIÓN ENTRE LA DIVISIÓN TEMPRANA, DESARROLLO EMBRIONARIO Y CALIDAD EN ESTADIO DE BLASTOCISTO EN SISTEMAS TIME-LAPSE.

A. Martínez Moro, N. Uriarte Beitia, J. García Blanco, M. Cuadros Vargas, L. López Yáñez
ProcreaTec, Madrid
a.martinez.moro@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

La aparición de los sistemas time-lapse ha permitido un aumento de estudios en busca de nuevos marcadores no invasivos que faciliten la selección embrionaria reduciendo así el número de embriones por transferencia. Los marcadores aportados por esta tecnología han desplazado a la división temprana como indicador no invasivo de buena calidad embrionaria, empleándose otros como el t3 o t5.

OBJETIVOS:

El presente estudio pretende corroborar la importancia de la división temprana, en el desarrollo embrionario y la calidad de los blastocistos obtenidos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se analizaron 481 embriones procedentes de 879 ovocitos de donantes microinyectados y posteriormente monitorizados mediante sistema time-lapse, desde la fecundación hasta el estadio de blastocisto en día 5. Los datos fueron agrupados en función de la primera división celular (grupo 1: <23h; grupo 2: 23-26h; grupo 3: >26h). Dentro de los grupos 1 y 2, se hicieron dos subgrupos Sgrupo 1.1: 19-22h y Sgrupo 1.2: 22-23h; Sgrupo 2.1: 23-24,5h y Sgrupo 2.2: 24,5 a 26h. La calidad morfológica fue agrupada en día 2-3 como óptima (A y B), media (C) y subóptima (D). Los mismos subgrupos se realizaron para el estadio de blastocisto, teniendo por calidad óptima a aquellos embriones con grado de expansión superior o igual a 4, además de trofoectodermo y masa celular interna de grado B o superior. Dentro de la calidad media

se agruparon aquellos embriones con blastocelo superior o igual a 4 y con una gradación de trofoectodermo o masa celular de grado C. Por último, los blastocistos con trofoectodermo y masa celular interna C o grado de expansión 3, fueron agrupados dentro del grupo de calidad subóptima. Los datos se analizaron mediante el estadístico Chi cuadrado además de establecerse un árbol de decisión donde se observó la probabilidad de obtención de cada una de las calidades de blastocisto en función de la división temprana junto con el desarrollo embrionario.

RESULTADOS:

Según nuestros resultados, los embriones que dividieron antes de las 23h tienen mayor potencial de obtener buena calidad morfológica en día 2-3. En el análisis intragrupal de aquellos embriones con división previa a las 23 horas, se observaron diferencias significativas entre la calidad tipificada como óptima frente a la calidad media y subóptima ($P < .001$). Los embriones en estadio de blastocisto con mejor calidad morfológica fueron aquellos cuya primera división embrionaria se encontraba dentro del rango de las 23-26 horas. Se observó una tendencia en los embriones que habían realizado su primera división celular antes de las 24.5 horas, obteniendo mejores gradaciones morfológicas en día 2-3, además de desarrollar blastocistos de mejor calidad. Pese a que los embriones divididos antes de las 23h mostraron mejor morfología durante los días 2-3, la evolución de éstos hasta un blastocisto de buena calidad fue del 4% frente al 17% de los embriones que dividieron entre las 23-24.5 horas.

CONCLUSIONES:

La primera división celular es un indicador de buen pronóstico embrionario durante las primeras fases del desarrollo. No todos los embriones que dividieron antes de las 23h, de buena calidad en día 2-3, obtienen una calidad óptima en estadio de blastocisto. Embriones con desarrollo óptimo durante los días 2-3 tienen un mayor potencial de llegada a blastocisto. Por tanto, los embriones con división celular previa a las 24.5 horas presentan un mejor desarrollo durante los días 2-3, aumentando su probabilidad de llegada a blastocisto.

BIBLIOGRAFÍA:

Cruz M, Garrido N, Herrero J, Pérez-Cano I, Muñoz M, and Meseguer M. Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality *Reproductive BioMedicine Online*. 2012; 25:371- 381.

Dal Canto MB, Coticchio G, Renzini MM, De Ponti E, Novara PV, Brambillasca F, Comi R e Fadini R. Cleavage kinetics analysis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation *Reproductive BioMedicine Online*. 2012; 25:474- 480.

Wong C, Chen AA, Behr B, and Shen S. Time-lapse microscopy and image analysis in basic and clinical embryo development research. *Reproductive BioMedicine Online*. 2013; 26:120-129.

P-101 RESULTADOS PERINATALES TRAS INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN FUNCIÓN DEL GRADO DE FRAGMENTACIÓN DE DNA Y LA TÉCNICA DE CAPACITACIÓN

A. Burguera Girau, M. de la Orden Rodríguez, P.J. Fernández Colom, J.M. Rubio Rubio
Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia
alba.biologia0712@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

El estudio del ADN espermático puede ayudar a la elección del sistema de capacitación que mejor seleccione espermatozoides en función una menor proporción de daño en el ADN para su uso en Inseminación artificial (IA), además de considerarse un parámetro independiente e indicativo de calidad. La mayoría de estudios muestran una correlación entre daño en el ADN espermático e índice de embarazo. La voluntad de mejorar nuestros resultados obliga a la optimización de nuestras técnicas de capacitación y a la elección de la tinción de naranja de acridina como medidor de la fragmentación de ADN en espermatozoides para IA.

OBJETIVOS:

Valorar la influencia de la técnica de capacitación (Gradiente vs Swim-Up) y la fragmentación de DNA (tinción con naranja de acridina) en la tasa de recién nacido vivo (RNV) tras IA realizadas en 2013 en el Programa de Reproducción Asistida del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Realizamos un análisis retrospectivo de la base de datos de la Unidad de Reproducción del Hospital La Fe de Valencia, para evaluar el número de recién nacidos vivos (RNV) resultantes del periodo de inseminación Septiembre-Diciembre de 2013. Realizamos el análisis mediante Chi-cuadrado en muestras categóricas (técnica de capacitación, sexo y tipo de

parto) para ver si este resultado estaba influenciado por el uso de diferentes métodos de capacitación, y mediante ANOVA para muestras cuantitativas (fragmentación de ADN, semana de parto y peso al nacer).

RESULTADOS:

De las 15 gestaciones logradas utilizando Gradientes como método de capacitación, las 15 dieron lugar a RNV, sin embargo de las 9 gestaciones logradas mediante Swim-Up como método de capacitación, 3 de ellas se perdieron (2 abortos y un embarazo ectópico). Las diferencias obtenidas en cuanto a RNV resultaron ser estadísticamente significativas ($p_{\text{valor}} = 0.026$). Al evaluar si las dos técnicas influían en el sexo del RNV, semana de parto, peso del RNV o tipo de parto, no se obtuvieron diferencias en las 3 primeras (p_{valores} de 0.268, 0.258 y 0.870, respectivamente); sí que se obtuvieron diferencias significativas en el tipo de parto ($p_{\text{valor}} = 0.032$), sin embargo este dato, junto con el p_{valor} del sexo del RNV no debe ser considerado ya que el análisis estadístico se realizó con número de muestras insuficientes según indicado en el programa informático empleado SPSS. También se analizó si la fragmentación del ADN de la muestra espermática se correlacionaba con la consecución de un RNV, y obtuvimos un p_{valor} de 0.14 que nos muestra que no existe correlación.

CONCLUSIONES:

Aunque la tasa de gestación se ve influenciada ($p_{\text{valor}} 0.08$) por la

técnica de capacitación utilizada, y el número de RNV utilizando la técnica de Gradientes es significativamente mayor que los RNV empleando Swim-Up ($p_{\text{valor}} 0.026$), no parece existir relación entre los valores de fragmentación del ADN espermático y la consecución de un RNV en casa. Tampoco el sexo del bebé, ni la semana de parto o peso del niño se ven influenciados por la técnica de capacitación empleada. Parece existir algún tipo de diferencia en cuanto al tipo de parto, pero no se puede tener en consideración ya que el análisis estadístico indicó un número de muestras insuficiente para obtener conclusiones válidas. Deben ser puestos en marcha nuevos estudios dirigidos a confirmar estos resultados, y evaluar si el efecto reside en la técnica de capacitación, o en los medios de diferentes casas comerciales empleados.

BIBLIOGRAFÍA:

Burguera Girau A, de la Orden Rodríguez M, Martínez Sanchís JV, Fernández Colom PJ, Rubio Rubio JM. Evaluación de dos métodos de capacitación espermática (Swim-Up y Gradientes) mediante el estudio de la morfología, madurez y fragmentación del ADN de los espermatozoides en muestras destinadas a inseminación artificial (IA). *Revista ASEBIR* 2014;19:30-35.

Jayaraman, V., Upadhya, D., Narayan, P.K. & Adiga, S.K. 2012, Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage, *Journal of assisted reproduction and genetics*, vol. 29, no. 6, pp. 557-563.

P-102 HACIA UNA CLASIFICACIÓN EMBRIONARIA UNIVERSAL: LA PROBABILIDAD DE IMPLANTACIÓN.

F. Graña Zanón, LM. Rodríguez Menes, D. Llana Suáres, V. Sánchez Blasco, JC. Quintana Paunette, E. García Alvarez, AP. Llana Coto, PE. De la Fuente Ciruelas, C. García-Ochoa Del Fresno
 CEFIVA, Oviedo, Asturias
fernando@cefiva.com

INTRODUCCIÓN:

Las clasificaciones actuales de los embriones se basan, hoy día, en la asignación de los embriones a grupos de distintas "calidades", utilizando para ello variables tanto cualitativas como cuantitativas. El problema de estas clasificaciones es doble, por una parte diferentes laboratorios utilizan distintas clases, y por otra se establece un reducido número de categorías, siendo muy probable que dos embriones pertenezcan a la misma clase. Los cultivos con sistemas de grabación a intervalos temporales incrementan en gran medida la información que disponemos sobre los embriones, y, aunque en principio, pueden dificultar la interpretación de los datos, nos dan la posibilidad de utilizar técnicas multivariantes de gran potencia estadística.

OBJETIVOS:

En este estudio nos proponemos contrastar diferentes técnicas numéricas con un objetivo común, obtener la probabilidad de implantación de un embrión, a partir de todos los datos que tenemos a nuestra disposición.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se han utilizado, en un estudio retrospectivo, 606 embriones cultivados en un sistema time-lapse (Embryoscope), desde enero de 2012 hasta diciembre de 2014, de los que se conocía su final (implantación o no). Se han realizado diversas técnicas de análisis numérico mediante el programa SPSS y el programa de libre distribución WEKA, este último está orientado exclusivamente a las clasificaciones, y cuenta con numerosos módulos de mejora gratuitos, entre ellos, alguno para redes neuronales (inteligencia artificial).

RESULTADOS:

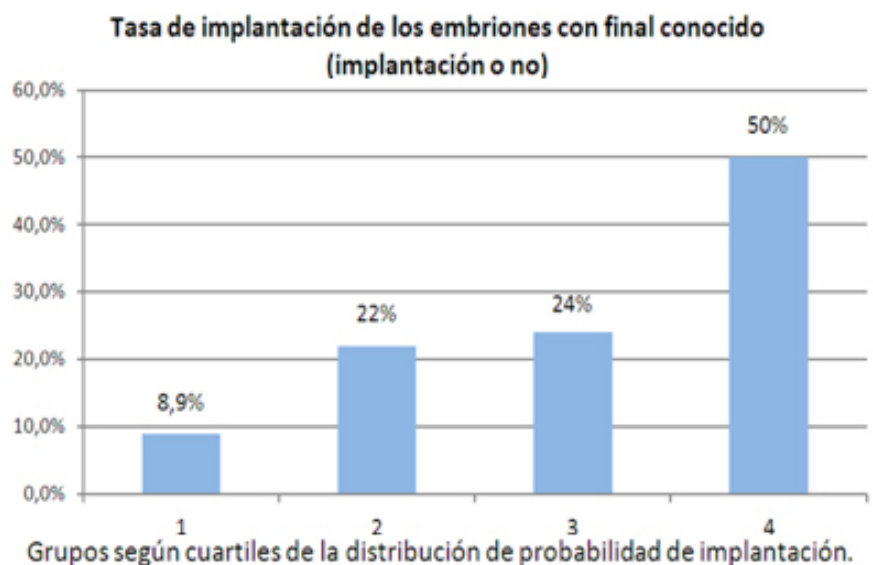
Los resultados han sido en gran medida congruentes en los distintos procedimientos. Los sistemas de redes neuronales son los únicos que detectan relaciones no lineales entre las variables, pero adolecen de dos problemas, el sobreajuste y la dificultad de implementación en las técnicas de modelado de nuestro sistema time-lapse. La red más apropiada para la clasificación es el perceptrón multicapa con retroregulación, y hemos comprobado que basta una única capa oculta para obtener buenos resultados.

El análisis discriminante, a pesar de ser el más potente estadísticamente, exige normalidad multivariante, lo que reduce las variables predictoras a únicamente las cuantitativas que cumplan dicho supuesto. Entre los modelos de regresión múltiple destaca la regresión logística binaria. Es una técnica muy conocida y, por ende, muy estudiada, con lo que se dispone de gran cantidad de bibliografía. Tiene, además la ventaja de utilizar todo tipo de variables, tanto nominales como ordinales o cuantitativas.

Las variables que nos han resultado más relevantes a la hora de predecir la implantación han sido: como cuantitativas, el tiempo de aparición y desaparición de los pronúcleos y los tiempos de división a 2 y 4 y 5 células (aunque estos dos últimos con menor fuerza); como cualitativas, la fragmentación en ocho células y la igualdad de blastómeras en 2 células.

Por lo comentado, se ha utilizado el método de regresión logística para calcular la probabilidad predicha para cada embrión. La forma de comprobar el modelo, a la espera de verificarlo con datos futuros en un estudio prospectivo, ha sido la siguiente: los embriones han sido divididos en 4 grupos de probabilidad creciente a partir de los cuartiles de su distribución (podrían haber sido 10 o más, pero la finalidad del modelo no es formar grupos), y se ha calculado la implantación real de cada grupo.

Los resultados se observan en la gráfica adjunta.



CONCLUSIONES:

Los modelos matemáticos multivariantes nos ofrecen la posibilidad de asignar probabilidades de implantación a

los embriones. Aconsejamos utilizar un análisis con redes neuronales para detectar las mejores variables predictoras, y la regresión logística para elaborar el modelo e implementarlo en

nuestra aplicación particular, eso sí, con una previa transformación de las variables no lineales para que las pueda aprovechar el método logístico.

P-103 FISH EN ESPERMATOZOIDES ALTERADO ¿APORTA EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL (DGP) VENTAJAS EN ESTAS PAREJAS?.

A. Fabregat Reolid (1), N. Baeza Pérez (1), JA. Ortiz Salcedo (1), B. Lledo Bosch (1), R. Morales Sabater (1), J. Ten Morro (2), MC. Tio Marquina (2), J. Llacer Aparicio (2), R. Bernabeu Pérez (2)

(1) Instituto Bernabeu Biotech, Alicante, (2) Instituto Bernabeu, Alicante.

afabregat@institutobernabeu.com

INTRODUCCIÓN:

Desde que el ICSI pasó a ser una técnica segura y habitual en la práctica clínica en el ámbito de la fertilidad, la infertilidad masculina pasó a estar infravalorada ya que hizo posible el uso de espermatozoides procedentes de varones con parámetros seminales seriamente comprometidos.

En general, se estima que aproximadamente el 20 % de los embarazos resultan en abortos de primer trimestre. Además, es bien conocido que las aneuploidías embrionarias representan una de las principales causas del fracaso implantatorio y del aborto temprano.

OBJETIVOS:

Estudiar la correlación entre la presencia de aneuploidías en los espermatozoides y la transmisión de estas anomalías en los embriones.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se realizó un estudio observacional retrospectivo. El periodo de estudio abarcó entre el 2007 y el 2013 para los embriones biopsiados en día 3 y 2014 para los embriones biopsiados en día 5. El DGP fue indicado en parejas que acudieron a nuestro centro y que presentaban problemas de fertilidad.

En total, fueron biopsiados y diagnosticados 834 embriones procedentes de 140 ciclos de TRA. De estos, 634 embriones fueron diagnosticados mediante FISH tras biopsia en día 3 y 200 mediante a-CGH tras biopsia en día 5.

Para el FISH en espermatozoides se analizaron 7 cromosomas (X,Y,13,16,18,21 y 22) y 9 (X,Y,13,15,16,17,18,21 y 22) para el FISH (SGP) en blastómeras.

Para el a-CGH se utilizó Agilent SurePrintG3 8x60K tras amplificación del genoma de células del trofoectodermo.

RESULTADOS:

De los 834 embriones biopsiados, el 49.4 % fueron aneuploides. De forma global, se encontraron diferencias significativas en términos de aneuploidía embrionaria entre embriones procedentes de varones con FISH en espermatozoides alterado (64.5 %) y normal (49.4 %) ($p < 0.05$).

Para aquellos embriones diagnosticados por a-CGH, encontramos también diferencias significativas en la tasa de aneuploidías embrionarias dependiendo de si el varón tenía un FISH en espermatozoides alterado (68.6 %) o normal (39.6 %) ($p < 0.05$).

Sin embargo, no encontramos esta diferencia cuando se analizaron los embriones por SGP.

También se consideraron otros parámetros como la calidad seminal obteniendo diferencias significativas entre la presencia o no de un seminograma alterado y las aneuploidías embrionarias. Así pues, el 60% de los varones con alteraciones en el seminograma tuvieron embriones aneuploides frente al 52.17% de los varones con seminogramas normales ($p < 0.05$). Además de la calidad seminal, también tuvimos en cuenta la fragmentación del DNA espermático en relación con las aneuploidías embrionarias no encontrando en este caso diferencia significativa ($p = 0.736$).

CONCLUSIONES:

Tras analizar nuestros resultados, concluimos que la probabilidad de encontrar embriones con alteraciones cromosómicas es significativamente mayor en aquellos varones con FISH en espermatozoides alterado para al menos uno de los cromosomas analizados respecto a aquellos varones con FISH en espermatozoides normal.

P-104 DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL (DGP) DE TRANSLOCACIONES MEDIANTE ARRAYS DE HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA (ACGH): DATOS DE EMBARAZOS.

E. Garcia Guixé (1), EM. Armenti (2), A. Jordan (2), D. Goldberg-Strassler (2), R. Cabey (2), C. Giménez Sevilla (1), M. Sandalinas (1), S. Munné (1)

(1) Reprogenetics Spain, Barcelona, (2) Reprogenetics

egarcia@reprogenetics.es

INTRODUCCIÓN:

Los pacientes portadores de translocaciones recíprocas (RECT) o Robertsonianas (ROBT) tienen un riesgo incrementado de sufrir fallos de implantación, abortos de repetición y/o el embarazo de un feto afecto. Esto es debido a la producción de un elevado número de gametos desequilibrados según los diferentes tipos de segregación cromosómica. Además, también se producen embriones aneuploides debido al efecto intercromosómico y al efecto de la edad materna.

OBJETIVOS:

Estudio retrospectivo de los embarazos conseguidos mediante ciclos de FIV-DGP para pacientes portadores de RECT o ROBT.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se han analizado 3477 embriones (1590 blastocistos (45.73%) y 1887 blastómeros (54.27%)) de más de 550 ciclos de DGP en pacientes portadores de RECT o ROBT.

Antes del DGP, el 16.9% de las pacientes eran nuligrávidas y, de las pacientes

que habían tenido algún embarazo, el 69.9% había sufrido algún aborto (el 36.1% con abortos de repetición, 3 o más abortos). El 25% de las pacientes con abortos tuvieron, al menos, 1 pérdida de un feto desequilibrado por los cromosomas implicados en la translocación. El 30.9% de las pacientes había tenido un embarazo de un niño sano previo a la realización del DGP.

RESULTADOS:

De los más de 550 ciclos realizados se dispone de datos de embarazo de 164 ciclos. La media de edad materna es de 34.3 años (rango=23-46).

Un 27.6% de las pacientes no tuvo ningún embrión euploide (normal/equilibrado) para transferencia. La tasa de embarazo/transferencia es del 61.6% (101/164). De estos embarazos, el 60.4% llegó a término y resultó en el nacimiento de un niño sano y el 23.8% son gestaciones en curso. El 15.8% restante fueron gestaciones que no continuaron: 4% fueron gestaciones anembrionarias, 10.9% resultó en un aborto y 1 embarazo fue interrumpido por la identificación en el feto de una enfermedad del corazón inespecífica. De las pacientes que consiguieron

embarazo el 67.5% tenía una historia previa de abortos.

CONCLUSIONES:

Debido al elevado número de embriones desequilibrados en ciclos de DGP de pacientes portadores de RECT o ROBT, más del 25% de los ciclos no tuvieron transferencia. Los embarazos para pacientes portadores de RECT o ROBT sin DGP tienen elevadas posibilidades de terminar en un aborto (del 35-65% en Gardner et al., 2012 y Sugiura-Ogasawara et al., 2004, respectivamente, comparado con el 15% de este estudio). En este estudio el 61.6% de los casos terminaron en embarazo. El DGP mediante aCGH reduce las tasas de abortos en este grupo de pacientes y se obtiene unas buenas tasas de embarazo.

BIBLIOGRAFÍA:

Gardner et al., 2012. *Chromosome Abnormalities and genetic counselling*. 4th edition. Oxford university press:110-151.

Sugiura-Ogasawara et al., 2004. *Fertil Steril*, 81:367-374.

P-105 DESARROLLO DE UN SIMULADOR DE PUNCIÓN FOLICULAR DENTRO DE PLAN DE FORMACIÓN GINECOLÓGICA REPRODUCTIVA.

J. Mijares Gordún, E. Matilla Pinto, N. Hernández Rollán, C. Tobajas Vega, IS. Álvarez Miguel, FM. Sánchez Margallo
Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, Cáceres
jmijares@ccmijesususon.com

INTRODUCCIÓN:

En el Centro de Cirugía de Mínima Invasión de Cáceres (CCMIJU) estamos desarrollando un plan de formación en Ginecología Reproductiva. La punción folicular es una técnica que se realiza rutinariamente en reproducción asistida (1). Los ginecólogos y residentes deben aprender observando la realización de esta técnica a otro compañero experto hasta el día en que deban realizarla sobre un paciente. Hemos creado y estamos validando un simulador de aspiración folicular transvaginal inerte, y comparamos su utilización entre especialistas expertos e inexpertos. Existen dos tipos de Estrategias a la hora de validar un dispositivo: subjetiva y objetiva. Para nuestro caso en concreto, hemos procedido a la primera parte de la validación.

Se define como Estrategia Subjetiva la valoración por parte de los usuarios de la apariencia y contenidos del aparato. Si lo hacen expertos en la materia sería una validación de contenidos. Si por el contrario, lo hacen usuarios noveles se denomina validación aparente (2).

OBJETIVOS:

Este trabajo tiene como objetivo poder disponer de un nuevo elemento de simulación en la punción folicular como técnica de reproducción asistida, para ello realizamos la Primera de las Estrategias de Validación de cualquier simulador: de contenidos y aparente.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Este simulador se compone de un útero al que se le han adherido dos ovarios

compuestos de látex/silicona. Permite la entrada de la sonda vía vaginal y su punción, a la vez que también existe la posibilidad de realizar la medición de los folículos con sonda abdominal. Una vez comenzada la punción, se recogen datos del tiempo en que tardan en realizar la técnica, número de folículos que son capaces de medir y puncionar, volumen de líquido folicular recogido. Se realizan encuestas de satisfacción valoradas de 1 (muy negativo) a 5 (muy positivo) en aspectos como utilidad, diseño, grado de aprendizaje, en la escala de Likert y encuestas poblacionales, valorando aspectos como experiencia previa, mano dominante,... Para realizar la siguiente validación diferenciamos entre usuario experto (n=7) o no experto (n=31). El usuario experto definimos que es aquella persona que cumple los siguientes requisitos: No residente, Ginecólogo, 13 puntos de valoración o más en los siguientes apartados puntuados del 1 al 4, tales como Experiencia en Reproducción, Experiencia en Punción, Experiencia Ecográfica y Experiencia en Manejo Videojuegos. Consideramos que son 4 habilidades/conocimientos principales que pueden influir en la realización de esta técnica.

RESULTADOS:

Los resultados de la Validación de Contenidos una vez realizada la encuesta de satisfacción por los usuarios expertos, fue un 88% positiva (≥ 4 puntos) en cuanto al diseño, un 91% positiva en cuanto al grado de aprendizaje y un 91% positiva en cuanto a su utilidad. El 100% recomendaría su uso y también el 100% creen que su uso es aplicable a la clínica.

Los resultados de la Validación de Aparente una vez realizada una encuesta de satisfacción por los usuarios no expertos, fue un 87.09% positiva en cuanto al diseño, un 80.64% positiva en cuanto al aprendizaje y un 86.45% positiva en cuanto a su utilidad. El 100% lo recomendaría y también el 100% creen que es aplicable en clínica. Además más del 50% creen que han avanzado mucho tras la prueba, con tan solo un 6% en donde opinan lo contrario.

Conclusiones:

En la actualidad no existe ningún curso de punción folicular con modelos inertes donde poder experimentar y a la vez adquirir la destreza necesaria para una correcta aspiración de los folículos. Los resultados preliminares sugieren que nuestro simulador dispone de una elevada aceptación por parte de los usuarios tanto para la validez aparente como la de contenidos.

BIBLIOGRAFÍA:

1. WickIand M, Enk L, Hamberger L. Transvesical and transvaginal approaches for the aspiration of follicles by use of uItrasound. *Ann N Y AcadSci* 1985;442: 182-94.
2. Schijven M, Jakimowicz J. Face, expert, and referent validity of the Xitact LS500 laparoscopy simulator. *Surg Endosc* 2002;16(2):1764-1770.

P-106 NO MEJOR, SINO ANTES. INTRODUCCIÓN DEL SISTEMA EEVA EN LA PRÁCTICA HABITUAL

M. Lierta Sancho, C. Roméu Périz, A. Chueca Villanueva, C. De Bonostro Torralba, I. Giménez Blasco, A. Urries López
Hospital Quirón-Salud Zaragoza, Unidad de Reproducción Asistida Zaragoza
mlierta.zar@quiron.es

INTRODUCCIÓN:

Con el fin de mejorar la selección embrionaria se han diseñado unos biomarcadores en un sistema de imagen time-lapse, que están proporcionando información objetiva para mejorar dicha selección. Debido a que el análisis manual de imágenes con time-lapse es trabajoso y limita el uso práctico en la clínica, un software de análisis de imagen contribuye sustancialmente a la mejora de la precisión de la selección. El Test Eeva (Early Embryo Viability Assessment), es un prueba predictiva y no invasiva, que ayuda a la selección del mejor embrión clasificándolo en "alta", "media" o "baja" probabilidad de desarrollo, basándose en unos hitos de división de los embriones de Día 1 a Día 3. Los ritmos de división celular han demostrado ser un buen marcador para predecir las posibilidades de implantación de un embrión. (Chen et al.).

OBJETIVOS:

Evaluar la tasa de embarazo de embriones seleccionados mediante el Test Eeva para poder poner en

práctica la transferencia de un único embrión (SET) y determinar el número de transferencias necesarias para conseguir gestación.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Es un estudio retrospectivo, en el que se analizan 497 transferencias de las cuales en 359 de ellas no se realiza el Test Eeva y en 138 si se realiza el Test, las pacientes presentan una edad media NO EEVA: 34,71±6,41 y edad media EEVA: 34,46±5,06. Con una media de embriones transferidos en el caso de NO EEVA de 1,89±0,48 y de EEVA de 1,98±0,46. Se compara el porcentaje de embarazo según se ha utilizado Eeva o no para la lasificación embrionaria en ovocitos propios (OVOPROP) y de donante (OVODON), así como las transferencias necesarias para generar un embarazo. Para el estudio se utiliza un microscopio equipado con una cámara especial colocado dentro del incubador que captura vídeos de cada uno de los embriones, estos vídeos son analizados por un software que evalúa los patrones y los tiempos de cada división celular e identifica aquellos embriones con mayor potencial de

desarrollo. Los marcadores de time-lapse y sus tiempos para la formación de blastocistos son: HIGH, P2: 9,20 horas <=P2<=11,28 horas; P3: 0<=P3<=1,44 horas. MEDIUM, no forma parte de high y P2: 9,20 horas <= P2<=12,39 horas; P3: 0<=P3<=4 horas. LOW, no forma parte de high ni medium. (P2= tiempo entre la primera y segunda mitosis (o de 2 a 3 células) P3= tiempo entre la sincronía de la segunda y tercera mitosis (o de 3 a 4 células) (Wong et al.)).

RESULTADOS:

El uso complementario de la morfología más el Test Eeva mejora la capacidad para identificar el embrión de mejor desarrollo. Comparamos los porcentajes de embarazo en pacientes que se realiza el Test Eeva y en las que no se realiza (58,52% vs 52,92%): en OVOPROP (53,40% vs 47,45%) y en OVODON (82,35% vs 70,58%) (Tabla 1). Así como el número de transferencias necesarias para generar un embarazo (1,70 vs 1,89): en OVOPROP (1,87 vs 2,11) y OVODON (1,21 vs 1,42) (Tabla 2).

	NO EEVA			EEVA		
OVOPROP	47,45%	NO SGE	48,16%	53,40%	NO SGE	53,57%
		SGE	41,38%		SGE	52,94%
OVODON	70,58%	NO SGE	70,67%	82,35%	NO SGE	76,92%
		SGE	70,00%		SGE	100%

TABLA 1. Porcentaje de embarazo según se ha utilizado Eeva o no. SGE: Selección genética de espermatozoides.

	NO EEVA			EEVA		
OVOPROP	2,11	NO SGE	2,08	1,87	NO SGE	1,87
		SGE	2,42		SGE	1,89
OVODON	1,42	NO SGE	1,42	1,21	NO SGE	1,30
		SGE	1,43		SGE	1

TABLA 2. Transferencias necesarias para generar un embarazo según se ha utilizado Eeva o no.

CONCLUSIONES:

El Test Eeva nos ha permitido aumentar las tasas de embarazo tanto en ovocitos propios (53,40% vs 47,45%) como en ovocitos de donante (82,35% vs 70,58%), necesitando así menor número de transferencias para generar un embarazo, en OVOPROP harían falta (1,87 vs 2,11) y en OVODON (1,21 vs 1,42). Con estos resultados podíamos concluir que el Test Eeva no mejora la calidad de los embriones pero si

consigue que podamos seleccionar antes el embrión con mayor probabilidad de implantación.

BIBLIOGRAFÍA:

Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. Connie C Wong, Kevin E Loewke, Nancy L Bossert, Barry Behr, Christopher J De Jonge, Thomas M Baer & Renee A Reijo Pera. Nature Biotechnology 2010.

Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial. Conaghan J1, Chen AA, Willman SP, Ivani K, Chenette PE, Boostanfar R, Baker VL, Adamson GD, Abusief ME, Gvakharia M, Loewke KE, Shen S. Fertility and Sterility. 2013.

P-107 VITRIFICACIÓN EN ESTADIO DE CELULAS VERSUS VITRIFICACION EN ESTADIO DE BLASTOCISTOS EN EL PROGRAMA DE FIV

M. Grosssmann Camps, A. Rabanal Anglada, C. Selva Viñals, O. Serra Ortiz, R. Olivares Vela
Barcelona IVF, Barcelona
mark.grossmann@bcnivf.com

INTRODUCCIÓN:

Con el nacimiento del primer niño a partir de embriones criopreservados (1985), todos los centros de reproducción humana asistida implementaron los protocolos de criopreservación lenta, que rápidamente se consolidaron como una potente herramienta de mejora de los programas de Reproducción Humana Asistida. Con la puesta a punto del cultivo in vitro hasta D+5/D+6 y la irrupción de la vitrificación quizás se criopreserven menos embriones, pero la calidad de los mismos debería ser mejor.

Presentamos un estudio retrospectivo de nuestros resultados en vitrificación en estadio de células comparados con los de vitrificación en estadio de blastocisto durante el período octubre 2013 - marzo 2015 porque a mediados del año 2014 cambiamos de estrategia y pasamos a transferir y vitrificar en D+5.

OBJETIVOS:

Comparar nuestros resultados de vitrificación en estadio de células

versus los de vitrificación en estadio de blastocisto.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Para este trabajo se seleccionaron los ciclos de FIV con ovocitos propios y transferencia en fresco (excluidos los casos de TESE y DGP) que además tuvieron vitrificación de embriones. Los embriones se cultivaron en medios de la serie G5Plus (Vitrolife) y las transferencias, en D+3 o D+5, siempre fueron ecoguiadas y con catéter Wallace. Para la vitrificación/desvitrificación de los embriones no transferidos se siguió el protocolo de Kitazato con pajuelas Rapid-i (Vitrolife).

El análisis estadístico fue ANOVA, $P < 0,05$.

RESULTADOS:

El grupo de transferencia y vitrificación de embriones en estadio de células incluye 114 ciclos en mujeres entre 25 y 43 años (media de 36,6). Se transfirieron 214 embriones (media

1,9) y se obtuvieron 58 β hCG+ (50,8%). De los 56 ciclos sin gestación, en 18 casos se vitrificaron embriones (en total 70 embriones, media de 3,8). Hasta la fecha se han realizado 10 criotransfers de 21 embriones (media de 2,1) y se han conseguido 4 β hCG+ (40%). Tasa de supervivencia postdesvitrificación del 95,2%.

El grupo de transferencias y vitrificación en estadio de blastocisto incluye 129 ciclos en mujeres de entre 24 y 43 años [36,7 años de media]. Se transfirieron 198 embriones (media de 1,5) y se obtuvieron 70 β hCG+ (54,3%). De los 59 ciclos sin gestación, en 46 casos se vitrificaron embriones (en total 128 embriones, media de 2,8). Hasta la fecha se han realizado 29 criotransfers de 47 embriones (media de 1,6) y se han conseguido 13 β hCG+ más (44,8%). Tasa de supervivencia postdesvitrificación del 99%.

No hay diferencias entre los dos grupos en cuanto a edad, número de ovocitos MII, ni número de embriones 2PN conseguidos.

Se vitrifican significativamente menos blastocistos y se transfieren también menos en los criotransfers y no hay diferencias en la tasa de gestación en criotransfer.

CONCLUSIONES:

Como era de esperar, no hay diferencias en la población (edad, resultados de la estimulación, tasa de fecundación o media de embriones transferidos) ya que se trata del mismo centro y de los mismos criterios.

Tampoco hay diferencias en la tasa de gestación en la criotransferencia, pero transfiriendo significativamente menos embriones en el caso de los blastocistos.

Las diferencias se observan en la tasa de gestación después de la transferencia en fresco así como en el número de embriones criopreservados, siendo en ambos casos superior en el grupo de blastocistos, lo que corrobora nuestra decisión de extender el cultivo in vitro hasta el estadio de blastocisto.

Además, la significativa reducción en el número de embriones transferidos (tanto en fresco como en criotransfers) en el caso de los blastocistos disminuye el riesgo de embarazo múltiple.

P-108 CASO CLINICO: GESTACION CON USO DE MACS TRAS FECUNDACION ANOMALA CON ICSI Y PICSI

BM. Lozano Ruiz, A. Cardona Perez, V. Saez Martinez, MC. Torres López, S. Stoyanov Raykov, C. Valdera Simón, J. Martin Mateos, A. Santaolaya Gallardo

Fivrecoletos, Ciudad Real
acardona@fivrecoletos.com

INTRODUCCIÓN:

Se ha demostrado que la integridad del DNA espermático es un importante factor en las tasas de fecundación, calidad embrionaria y tasas de gestación. Actualmente dos técnicas se emplean en los laboratorios de reproducción asistida como método adicional para una mejor selección espermática, el ácido hialurónico (PICSI®) y las columnas de anexina V (MACS®).

OBJETIVOS:

Presentar un caso clínico en el que se obtiene embarazo con MACS® tras dos ciclos previos sin fecundación normal empleando ICSI y PICSI®.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Mujer de 33 y varón de 50 años que acude al centro por una esterilidad 1ª de dos años de evolución. Ella presenta niveles hormonales en día 2-3 del ciclo dentro de la normalidad. Al varón se le diagnostica oligoastenoteratozoospermia por lo que el caso se indica para ICSI.

En un primer ciclo se estimuló a la paciente siguiendo un protocolo con antagonistas. Se realizó la estimulación con FSHr y hMG-Hp, la ovulación fue inducida con hCGr. Los valores de estradiol y progesterona el día de la administración de la hCG fueron 2697 pg/ml y 1,09 pg/ml. El día de la punción la muestra de semen presentó los siguientes parámetros: 8,3 ml, 7 mill/ml, 30% motilidad a+b. Se recuperan 8 ovocitos, 7 MII se microinyectan y obtenemos dos fecundaciones anómalas y ninguna fecundación normal.

En un segundo ciclo se estimuló a la paciente siguiendo un protocolo corto con análogos. Se realizó la estimulación con hMG-Hp y la ovulación fue inducida con hCGr. Los valores de estradiol y progesterona el día de la administración de la hCG fueron 1199 pg/ml y 1,28 pg/ml. El día de la punción la muestra de semen presenta los siguientes parámetros: 7,4 ml, 8 mill/ml, 25% motilidad a+b. Se recuperan 4 ovocitos, 4 MII en los realiza PICSI®-ICSI. Obtenemos una fecundación anómala y ninguna fecundación normal.

En el tercer ciclo se estimuló a la

paciente siguiendo un protocolo corto con análogos. Se realizó la estimulación con hMG-Hp y la ovulación fue inducida con hCGr. Los valores de estradiol y progesterona el día de la administración de la hCG fueron 2972 pg/ml y 1,83 pg/ml. El día de la punción la muestra de semen presenta los siguientes parámetros: 7ml, 2 mill/ml, 50% a+b. Se recuperan 8 ovocitos, de los cuales 5 son MII se realiza MACS®-ICSI, logrando fecundación normal de 4 cigotos. En día 3 de desarrollo embrionario se transfieren dos embriones calidad B (criterio ASEBIR), a los que previamente se les realizó Assisted Hatching.

RESULTADOS:

Se realizó la β-hCG a los 14 días post-transfer y se obtuvo un valor de 726 mUI. A nivel ecográfico, 24 días después de la β-hCG, se visualiza un saco gestacional con vesícula vitelina y actividad cardíaca.

CONCLUSIONES:

La separación magnética de espermatozoides en columnas de anexina en este caso se revela como una

herramienta eficaz para solucionar un fallo de fecundación, consiguiendo una gestación única. No hemos encontrado bibliografía donde se compare ambas técnicas en un mismo paciente para resolver un fallo de fecundación y conseguir gestación, de ahí lo interesante de este caso. Es necesario que continuemos con el estudio para contar con un número suficiente de pacientes que aporten fiabilidad a los resultados.

BIBLIOGRAFÍA:

De Vantéry,C., Lucas,H., Chardonnens,D. y De Agostini,A. (2009). Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potencial. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7:1 Polak de Fried,E. y Denaday,F. (2010). Single and twin ongoing pregnancies in two cases of previous ART

failfure after ICSI performed with sperm sorted using annexin V microbeads. *Fertility and Sterility*, 94(1):351.e15-351.e18.

P-109 LA AMINOPEPTIDASA SENSIBLE A PUROMICINA (PSA) COMO POSIBLE MARCADOR DE CALIDAD FOLICULAR

C. Roméu Périz(1), M. Lierta(1), A. Urries(1), I. Muñoa(2), M. Gianzo(2), R. Casis(2)

(1) Hospital Quirón-Salud Zaragoza, Unidad de Reproducción Asistida, Zaragoza, (2) Universidad del País Vasco/EHU, Facultad de Medicina y Odontología, Departamento de Fisiología, Bilbao

cromeu.zar@quiron.es

INTRODUCCIÓN:

En los últimos años se ha venido describiendo el papel que los péptidos opioides endógenos pueden tener sobre la fertilidad, tanto masculina como femenina. Un sistema indirecto de estudio de los niveles de actividad opioidérgica sería estudiar su metabolismo degradativo mediante peptidasas, siendo la aminopeptidasa sensible a puromicina (PSA) una de las principales.

OBJETIVOS:

Comparar los niveles de actividad de PSA en el líquido folicular (LF) de mujeres fértiles en función de su edad. Así como determinar si la enzima PSA podría ser considerada un indicador pronóstico del éxito del tratamiento de FIV.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Las 73 muestras analizadas procedían tanto de donantes de óvulos como de pacientes cuyo único problema reproductivo era el factor masculino severo. Durante la punción se recogió el LF del primer folículo aspirado. Los líquidos se agruparon según la edad de la mujer: 20-24 años (Grupo1);

25-29(G2); 30-34(G3); 35-39(G4); >=40(G5). Posteriormente se analizó la actividad enzimática en los cinco grupos en función tanto de la edad de la paciente como del resultado del ciclo de FIV (embarazo vs. no embarazo).

Las actividades se midieron fluorimétricamente utilizando sustratos del tipo aminoacil-2-naftilamida. Los resultados finales se expresaron como unidades de actividad peptidásica por litro de muestra (UP/Lmuestra). Se utilizó el test U de Mann-Whitney para hallar las diferencias entre los cinco grupos y la Rho de Spearman para el análisis de correlaciones bivariadas.

RESULTADOS:

En todos los LF se detectó actividad para la enzima PSA. Las mujeres de 40 o más años (G5) revelaron un incremento de actividad en comparación con el resto de grupos: G1 (P<0,001), G2, G4 (P<0,05) y G3, aunque en este el aumento no llegó a ser significativo (P=0,09). De hecho, se constató que la actividad de la PSA se correlaciona de forma positiva con la edad (r =+0,36; P=0,003). En las pacientes que lograron embarazo la actividad enzimática en los grupos con mayor

potencial reproductivo (G1, G2 y G3) se situó en torno a las 250UP/Lmuestra, para aumentar paulatinamente y encontrarse sobrepasando las 300UP/Lmuestra en el G5. Mientras que en el caso de las pacientes no gestantes la actividad obtenida en los cinco grupos sobrepasó o rozó los límites de la franja de 200?300UP/Lmuestra.

CONCLUSIONES:

PSA revela una tendencia clara: a mayor edad, mayor actividad enzimática.

Por ello podría ser considerada como un parámetro predictivo de calidad folicular, cuya franja de actividad óptima se establecería entre las 200 y las 300UP/Lmuestra.

La determinación de la actividad de PSA en LF podría convertirse en una herramienta útil para valorar las probabilidades de éxito del ciclo de FIV, ayudando a orientar a la paciente sobre sus opciones reproductivas y permitiendo realizar tratamientos cada vez más individualizados.

Agradecimientos: Merck-Serono.

P-110 EVALUACIÓN ECONÓMICA DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIÓN ÚNICO ELECTIVA (ESET) VERSUS LA TRANSFERENCIA DE DOS EMBRIONES (DET) EN FIV/ICSI: UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

ML. López Regalado (1), A. Clavero Gilabert (1), MC. Gonzalvo López (1), MA. Onieva García (1), B. Romero Guadix (1), E. Hernandez Torres (2), A. Guzmán Olmedo (1), P. Navas Bastida (1), M. Luengo Diaz (1), V. Diaz Prado (1)
(1) Unidad de Reproducción. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada. (2) Departamento Internacional y Economía Española de la Universidad de Granada, Granada
marisalopezregalado@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

La transferencia electiva de un embrión (eSET) constituye el medio más eficaz en la reducción de los embarazos gemelares en Reproducción Asistida. La eSET podría compensar en términos de coste-efectividad la disminución de la tasa de nacido vivo con la disminución de la tasa de embarazos múltiples.

OBJETIVOS:

Recopilar la evidencia relativa a la efectividad y el coste de la transferencia electiva de un embrión (eSET) frente a la transferencia de dos embriones (DET) y analizar la diferencia en relación coste-efectividad de la eSET versus DET.

MATERIAL Y MÉTODOS:

La revisión se realizó de acuerdo a las directrices de la guía PRISMA. Las bases de datos y registros consultados fueron Medline, EMBASE, Centro NHS para Revisiones y Difusión de base de datos de resúmenes de Revisión de la Eficacia (NHS CRD DARE), Centro NHS para Revisiones y Evaluación de Tecnologías Sanitarias (NHS CRD HTA), Centro NHS para Revisiones y Base de Datos de Evaluación Económica (NHS CRD EED), Cochrane Biblioteca y en el registro de ensayos clínicos de EE.UU. La búsqueda se realiza en enero de 2015 por dos revisores independientes.

Los estudios incluidos en esta revisión fueron evaluaciones económicas completas, en términos de coste (uso de recursos) y consecuencias (resultados, efectos), donde la intervención alternativa se comparó según el coste por unidad de efecto (análisis de coste-efectividad).

Para evaluar la calidad de los estudios incluidos, se utilizó la lista de control de calidad Drummond para evaluaciones económicas y de esta forma determinar si el método en cada estudio fue metodológicamente adecuado para los objetivos propuestos y si los resultados fueron válidos. Las discrepancias se resolvieron por consenso entre los revisores y los resultados de coste-efectividad se expresaron en porcentaje relativo.

RESULTADOS:

La búsqueda realizada permitió identificar un total de 179 referencias bibliográficas en las bases de datos consultadas. Tras eliminar duplicados, se revisaron por título y resumen 137, de las cuales, 31 fueron seleccionadas para su revisión a texto completo. Finalmente, se incluyeron 11 artículos en la revisión (18 escenarios analizados).

Cuando se analizaron todos los artículos se observó una reducción relativa

(-10%) en la tasa de nacido vivo con eSET y una reducción relativa (-15%) en el coste con eSET. La reducción de la efectividad no fue diferente al considerar la calidad de los estudios, la perspectiva del análisis ni la inclusión de las criotransferencias en los estudios.

La reducción de costes tampoco tuvo relación con la perspectiva del estudio ni la inclusión de criotransferencias en el diseño. Sin embargo, se observó una significativa mayor reducción en costes en estudios de buena calidad que en el resto de estudios (-31,8% vs -3,8%; $p < 0,05$). Esta relación directa significativa entre calidad de los estudios y reducción de costes con eSET se observó también cuando solo se analizaron estudios que tuvieron en cuenta las criotransferencias (-29,0% vs -2,7%; $p < 0,05$).

CONCLUSIONES:

La calidad de los estudios coste-efectividad de diferentes estrategias de transferencia embrionaria es heterogénea. Al considerar sólo estudios de alta calidad, la estrategia eSET es más coste-efectiva que DET.

P-111 ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN FIV-ICSI UTILIZANDO UN SISTEMA TIME-LAPSE VERSUS UN INCUBADOR CONVENCIONAL

B. Buch Tomé, M. Lara Lara, C. Alonso Muriel, C. Segura Garcia, M. Martínez Moya
 Lab. Reproducción Centro Gutenberg, Málaga
bbuch@urecentrogutenberg.com

INTRODUCCIÓN:

La aplicación de la tecnología time-lapse al sistema de cultivo de los embriones en FIV está aportando una gran cantidad de información de los primeros estadios de desarrollo embrionario (Kirkegaard et al 2015, Liu et al. 2014). Con los nuevos datos obtenidos se han publicado numerosas fórmulas y/o algoritmos, aplicados a la dinámica de división, con el objetivo de predecir el embrión con mayor potencial para implantar (Meseguer et al 2011). Además del empleo de estas formulas para clasificar y seleccionar a los embriones, el sistema de cultivo time-lapse ofrece otras diferencias respecto a un incubador convencional: el cultivo continuo optimiza la estabilidad en los parámetros de incubación, permite observar anomalías (multinucleación, divisiones anómalas de blastómeras, absorción de fragmentos, divisiones reversibles, etc.) en las primeras divisiones de los embriones que pueden ser independientes de la morfología final del embrión y, además, gracias a la grabación de imágenes, se puede observar el desarrollo de los embriones de manera continuada, más detallada y en cualquier momento. Todos estos factores pueden aportar un plus a los ciclos que se cultivan en un sistema time-lapse.

OBJETIVOS:

El objetivo de este estudio es comparar la tasa de embarazo, de implantación y de aborto entre los ciclos de FIV-ICSI con ovocitos propios, realizados durante los años 2013-2014, en un incubador con sistema time-lapse versus uno convencional.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se estudian 459 ciclos de ICSI-TE con ovocitos propios y un número de MII >5. En 246 ciclos (GRUPO A) los embriones fueron cultivados en un incubador convencional mientras que en los 213 restantes (GRUPO B) se cultivaron en un sistema time-lapse. Ambos grupos son similares en cuanto a las causas de esterilidad y edad de las pacientes (19-44 años / Media=36.28 años). En el 85% de los ciclos los embriones se transfirieron en estadio de células (día 2-3), en los ciclos restantes se transfirieron en estadio de blastocisto.

El incubador con sistema time-lapse utilizado fue el Embryoscope (E.C.) y el incubador convencional fue el Heracell 200.

Los embriones se han clasificado y seleccionado siguiendo los criterios de ASEBIR, para los incubados en el EC, además se ha tenido en cuenta la clasificación obtenida con el algoritmo publicado por el M. Meseguer en 2011.

RESULTADOS:

Los resultados se presentan por rangos de edad.

El número de ciclos, las tasas de gestación, de implantación y de aborto respectivamente en los grupos A y B fueron:

< 35 años: 104 vs 79, 58.65% vs 55.70%, 42.50% vs 42.06% y 9.84% vs 11.36%.

35-39 años: 95 vs 90, 53.68% vs 47.78%, 30.89% vs 31.61% y 13.72% vs 13.95%.

40-44 años: 47 vs 44, 36.17% vs 47.43%, 19.38% vs 26.59% y 35.29% vs 19.05%.

No se observan diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los resultados.

CONCLUSIONES:

Aunque no se han encontrado diferencias significativas entre los resultados de ambos grupos, se observa una tendencia a mejorar las tasas de gestación, de implantación y de aborto en el grupo de pacientes de mayor edad cuando se cultivan los embriones en el E.C. (grupo B).

Los resultados indican que con los datos que nos aporta el E.C. podemos hacer una mejor selección de los embriones que se van a transferir en mujeres de > de 40 años.

Según los datos obtenidos, serían interesantes futuros estudios comparativos del desarrollo embrionario en time-lapse entre los embriones de mujeres de > 40 años y las de < 40 años.

BIBLIOGRAFÍA:

Kirkegaard K., Ahlström A, Ingerslev H J, Hardarson T. Choosing the best embryo by time-lapse versus standard morphology. *Fertility and Sterility* 2015 Vol. 103 (2): 223-332.

Liu Y, Chapple V, Roberts P, Matson P. Prevalence, consequence, and significance of reverse cleavage by human embryos viewed with the use of the Embryoscope time-lapse video system. *Fertility and Sterility* 2014 Vol. 102 (5):1295-1300.

Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsoe KM, Birger Ramsing N, Remohí J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Human Reproduction* 2011, Vol.26 (10): 2658-2671.

P-112 CARACTERIZACIÓN DE LOS NIVELES DE SUPEROXIDO EN LOS ESPERMATOZOIDES Y EN EL PLASMA SEMINAL ¿HACIA UN MEJOR CONTROL DE LOS TRATAMIENTOS CON ANTIOXIDANTES?

M. de la Casa Heras (1), R. Santiso Brandariz (2), J.L. Fernández García (2), T. Sánchez Arenas (1), F. Arroyo Yebras (3), C. López Fernández (3), J. Gosálvez Berenguer (3)
(1) Clínica Ginefiv. José Silva 18, 28043 Madrid., (2) Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo, As Xubias 84, 15006 A Coruña., (3) Departamento de Biología. Universidad Autónoma de Madrid. 28049 Madrid
M.delacasa@ginefiv.com

INTRODUCCIÓN:

La existencia de un desequilibrio entre la presencia de aniones Super-Oxido (SOx) y los niveles de Super-Oxido Dismutasa disponible en un eyaculado, puede generar situaciones donde la incidencia de niveles altos de estrés oxidativo contribuyan a provocar daño, de orden y localización diversa, en los espermatozoides. Sin embargo, la caracterización de los niveles de SOx y otras especies reactivas de oxígeno en el eyaculado no es una tarea sencilla dado que las técnicas disponibles son complejas en su ejecución y requiere de equipamientos de alto coste.

OBJETIVOS:

1) Analizar las contribuciones de SOx, utilizando una reacción colorimétrica sencilla (OxiSperm) con objeto de 1) catalogar las respuestas colorimétricas en diferentes pacientes tanto en semen neto (SN), como en Plasma Seminal (PS) y en Espermatozoides (Ez), y 2) Visualizar la localización celular de las SOx que se generan.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio multicéntrico aleatorizado en el que se incluyeron 500 pacientes

con diferentes cuadros clínicos. El desequilibrio de SOx se evaluó con el kit OxiSperm (Halotech DNA, Madrid).

RESULTADOS:

Tras la reacción de colorimetría ofrecida por OxiSperm, se establecieron tres niveles de presencia de SOx en las muestra analizadas de acuerdo con el registro de una menor o mayor intensidad de color (Nivel L1: bajo; Nivel L2: medio y Nivel L3: alto). La prevalencia observada fue de un 21% para L1, 73% para L2 y 6% para L3. De forma paralela, se pudieron establecer tres tipos de pacientes de acuerdo con la respuesta de intensidad de color ofrecida por las diferentes fracciones del eyaculado (SN; PS; Ez y todos ellos generando respuestas negativa (-) o positiva (+). Paciente tipo 1: SN - / PS - / Ez -; Paciente tipo 2: SN + / PS + / Ez -; Paciente tipo 3: SN + / PS + / Ez +. La localización en el espermatozoide de los SOx se circunscribe esencialmente a la pieza intermedia y a la base de la membrana espermática.

Los niveles de precipitado por espermatozoide son variables y el número de espermatozoides afectados por muestra, también. En los pacientes afectados con leucocitospermia se

puede observar la actividad diferencial de los distintos leucocitos en la producción de SOx.

CONCLUSIONES:

La utilización de OxiSperm para evaluar los niveles de desequilibrio en favor de SOx es rápida y fiable cuando la prueba se realiza sobre SN. No obstante, el nivel de información obtenido en mayor, si se analizan por separado las dos fracciones esenciales del eyaculado (PS y Ez) y se contrastan los resultados colorimétricos con un análisis microscópico posterior para localizar la producción de SOx. El uso de OxiSperm puede tener sentido para discriminar pacientes que se podrían tratar con combinados antioxidantes por presentar altos niveles de daño en el ADN.

OxiSperm es altamente informativo para analizar la alta o baja actividad de los linfocitos presentes en el eyaculado en pacientes con leucocitospermia; hecho que se debiera relacionar con la intensidad de una presunta infección.

P-113 APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE SELECCIÓN ESPERMÁTICA MACS A TRATAMIENTOS DE OVODONACIÓN

J García Blanco, M Cuadros, N Uriarte, A Martínez Moro, A Ruiz-Ayúcar Dorado, L López Yáñez
Procreatec, Madrid
laboratorio@procreatec.com

INTRODUCCIÓN:

La selección inmunomagnética de células activadas (MACS) es una técnica de preparación seminal que permite aislar a los espermatozoides que no presentan fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática, lo cual es un marcador de apoptosis.

La utilización de MACS disminuye la proporción de espermatozoides fragmentados por lo que la indicación principal sería su aplicación en muestras que presenten fragmentación elevada.

En diferentes estudios se ha observado cómo la selección de espermatozoides para ICSI mediante esta técnica mejora las tasas de embarazo (Gil et al., 2013; Grunewalds & Paasch, 2013), e incluso la morfología (Curti et al., 2014). En cambio, existen estudios que indican que la utilización de la técnica MACS en ovodonación no mejora las tasas de fecundación, de calidad embrionaria, de implantación, de embarazo ni de nacido vivo (Romany et al., 2014).

OBJETIVOS:

Análisis de la aplicación de la técnica MACS en la práctica diaria y su contribución a los ciclos de ovodonación en los que ha habido previamente uno o más ciclos fallidos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se analizan 452 ciclos de ovodonación realizados durante el año 2014 de los que 382 son ciclos en los que no se ha realizado la técnica MACS y 70 son ciclos en los que se ha realizado la técnica MACS con la única indicación de uno o más ciclos previos fallidos, sin datos acerca de la fragmentación de la muestra o con una fragmentación menor del 30%.

RESULTADOS:

La tasa de embarazo clínico en los ciclos en los que se ha realizado MACS es significativamente superior (58,57%) respecto a los ciclos en los que no se ha realizado MACS (40,49%). ($p < 0,002$).

CONCLUSIONES:

La práctica diaria implica que no en todas las ocasiones las muestras seminales tienen un análisis de fragmentación, e incluso debido a la variabilidad a veces no es suficiente diagnóstico con una sola muestra que no presenta fragmentación mayor del 30%.

Nuestro estudio indica que la aplicación de la técnica MACS en un tratamiento cuyos pacientes ya han tenido ciclos previos fallidos se muestra

significativamente efectiva en los casos de ovodonación.

BIBLIOGRAFÍA:

Curti G., Skowronek F., Vernochi R., Rodriguez-Buzzi A. L., Rodriguez-Buzzi J. C., Casanova G & Sapiro R. Morphological evaluation of sperm from infertile men selected by magnetic activated cell sorting (MACS). *Reproductive Biology*. 2014. 14: 289-292.

Gil M., Sar-Shalom V., Melendez Y., Carreras R. & Checa M. A. Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis.

Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2013. 30: 479-485.

Grunewald S. & Paasch U. Sperm selection for ICSI using annexin V. *Methods in Molecular Biology*. 2013. 927: 257-262.

Romany L., Garrido N., Motato Y., Aparicio B., Remohi J. & Meseguer M.. Removal of annexin V-positive sperm cells for intracytoplasmic sperm injection in ovum donation cycles does not improve reproductive outcome: a controlled and randomized trial in unselected males. *Fertility and Sterility*. 2014. 102: 1567-1575. los previos fallidos se muestra significativamente efectiva en los casos de ovodonación.

P-114 ¿PUEDE LA TRANSFERENCIA DIFERIDA MINIMIZAR EL EFECTO DELETÉREO DE LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA EN PACIENTES CON ENDOMETRIOSIS Y MEJORA LA TASA DE EMBARAZO?

B. Migueles Pastor, M. Hebles Duvinson, L. Aguilera Duvinson, P. Piqueras Trilles, M. Gallardo Molina, P. Sánchez Martin, F. Sánchez Martin
Ginemed, Sevilla
bmigueles@ginemed.es

INTRODUCCIÓN:

La receptividad endometrial en pacientes con endometriosis se ve alterada por la inflamación y el estrés oxidativo que esta patología provoca en la cavidad pélvica. Por otro lado la estimulación ovárica provoca un efecto deletéreo en la receptividad endometrial alterando el diálogo entre el endometrio y el embrión. Diferentes estudios muestran la existencia de un patrón de secreción proteica diferente de ciclos estimulados respecto a los no estimulados. La transferencia de los embriones vitrificados en un ciclo no estimulado parece ser una opción para incrementar las tasas de embarazo en este grupo de pacientes.

OBJETIVOS:

Comprobar si en la transferencia de embriones vitrificados en pacientes con endometriosis la tasa de embarazo es mayor que si se realiza la transferencia de embriones en el ciclo en fresco tras la estimulación ovárica.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se ha realizado un estudio observacional retrospectivo en el que pacientes diagnosticadas de endometriosis realizaron un ciclo de FIV-ICSI entre Enero de 2014 y Diciembre de 2014. Se han comparado las tasas de embarazo

obtenidas en transferencias con embriones en fresco y con embriones vitrificados en este grupo de pacientes. El estudio incluye un total de 70 pacientes en las cuales se analizó en un primer momento la tasa de embarazo por transferencia embrionaria en fresco, y posteriormente, de las pacientes que no habían quedado embarazadas, se analizó la tasa de embarazo de los embriones vitrificados.

RESULTADOS:

De las 70 pacientes que realizaron ciclo de FIV-ICSI, llegaron a transferencia 61, con las que se obtuvo una tasa de embarazo en fresco: 45.9%. De las pacientes que no quedaron embarazadas y vitrificaron embriones, se han realizado hasta la fecha un total de 10 transferencias en las que se ha obtenido una tasa de embarazo del 60%.

CONCLUSIONES:

Los resultados obtenidos las transferencias de embriones vitrificados parecen ser superiores a los obtenidos tras la transferencia de embriones en fresco en pacientes diagnosticadas de endometriosis. Aunque los resultados son preliminares podemos ver que existe una tendencia positiva en la estrategia de transferir los embriones en ciclos sustituidos y no estimulados,

ya que al eliminar el efecto deletéreo que produce la estimulación ovárica sobre el endometrio, las tasas de embarazo se incrementan respecto a las obtenidas en ciclos con transferencias de embriones en fresco. Se hace necesario el incremento en el número de casos para confirmar la tendencia positiva de transferir en pacientes con endometriosis los embriones vitrificados en un endometrio que no ha sido sometido a la carga hormonal de la estimulación ovárica.

BIBLIOGRAFÍA:

Charlotte HE Weimar a,b,*¹, Emiel D Post Uiterweer a,c¹, Gijs Teklenburg b, Cobi J Heijnen a,d, Nick S Macklon a,e. (2013) In-vitro model systems for the study of human embryo?endometrium interactions. *Reproductive BioMedicine Online* 27, 461?476.

Xiyuan Dong, Xiuhua Liao, Rui Wang, Hanwang Zhang (2013) The impact of endometriosis on IVF/ICSI outcomes. *Int J Clin Exp Pathol* 6(9):1911-1918.

Ming-Qing, Li., Li-Ping Ji, (2013) Ovarian stimulation for in vitro fertilization alters the protein profile expression in endometrial secretion. *Int J Clin Exp Pathol* 6(10):1964-1971.

P-115 VALOR DE BETA HCG Y PRONÓSTICO EN LA EVOLUCIÓN DE LA GESTACIÓN

P. Ibáñez Rico, AA. Fernández-Peinado Martínez, J. Valdés López, A. Brotons Cuevas
Invitam Centro de Medicina Reproductiva, Alicante
paz_ibanez@outlook.es

INTRODUCCIÓN:

La hCG (gonadotropina coriónica humana) es una hormona que empieza a sintetizarse justo cuando se da la implantación del embrión en el útero. La beta hCG es una fracción de la hCG. Ambas, pueden ser utilizadas en el diagnóstico del embarazo. Normalmente los niveles de estas hormonas se duplican cada 2 o 3 días por lo que se debe esperar unos días para que la concentración de éstas alcance el nivel detectable a través de diferentes exámenes. En la mayoría de los laboratorios la beta hCG es considerada negativa cuando su valor es inferior a 2 mUI/ml.

OBJETIVOS:

Comprobar si realmente el resultado cuantitativo de la beta hCG obtenido en un tratamiento de reproducción asistida es un indicador clave de la evolución de dicha gestación.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se trabaja con el resultado de la beta hCG de 100 ciclos de FIV/ICSI, inseminación Artificial tanto con semen conyugal

como con semen de donante, ciclos de recepción de receptoras de ovocitos y ciclos de criotransferencia. Los ciclos se dividen en dos grupos. Aquellos ciclos en los cuales la beta fue positiva pero se obtuvo un embarazo bioquímico (hay implantación pero no evolución del embrión) y aquellos ciclos donde la beta fue positiva y además se obtiene un embarazo clínico. Para ambos grupos se realiza la media de todas sus betas hcg positiva comparándose de esta manera, si existen diferencias significativas entre ambos grupos.

RESULTADOS:

En los ciclos cuya gestación fue bioquímica obtenemos un rango de beta hCG positiva que va desde 2 a 87 mUI/ml, con un valor medio de 21 mUI/ml. En cambio, en aquellos ciclos cuya gestación fue clínica, se obtuvo un rango de beta hCG positiva de 20 a 479 mUI/ml, con un valor medio de beta hCG de 152 mUI/ml.

CONCLUSIONES:

Los valores de beta hCG menores a 21 mUI/ml son considerados de mal pronóstico en la evolución de la

gestación. En estos casos, se debe repetir el análisis a los 2 o 3 días para comprobar si el valor de hCG aumenta o disminuye. Si la gestación es evolutiva, los valores deberían de duplicarse aproximadamente cada 2 días. Valores entre 21 y 87 mUI/ml de beta hCG son casos de incertidumbre sobre la evolución de la gestación. Valores superiores a 87 mUI/ml son indicadores de que la probabilidad de que se trate de un embarazo en curso sea alta.

Dado que existen excepciones, se debe evaluar individualmente cada caso, transmitiendo a la paciente calma y serenidad hasta el próximo examen.

Nos encontramos trabajando aumentando la n de este estudio para intentar relacionar los resultados de la beta hCG con otros factores como el día en que se produce la transferencia de los embriones, la influencia del índice de masa corporal de la mujer o la influencia del factor seminal.

P-116 PROGRAMA DE DGP: PASO DE BIOPSIA EN D+3 A BIOPSIA EN D+5

M. Grossmann Camps, A. Rabanal Anglada, C. Puche Niño, C. Guix Galcerán, O. Serra Ortiz, R. Olivares Vela, L. Zamora Corzo
Barcelona IVF, Barcelona
mark.grossmann@bcnivf.com

INTRODUCCIÓN:

Con la puesta a punto del cultivo in vitro hasta D+6 no sólo tenemos la posibilidad de transferir embriones en estadio de blastocisto, sino también la posibilidad de realizar estudios de DGP a partir de biopsia de trofotodermo.

Presentamos un estudio retrospectivo de nuestros resultados en DGP en estadio de células comparados con los de biopsia en estadio de blastocisto durante el período enero 2011 - marzo 2015 porque que a mediados del año 2014 cambiamos de estrategia y pasamos a transferir y biopsiar en D+5.

OBJETIVOS:

Comparar los resultados de biopsia de blastómeros en D+3 versus biopsia de trofotodermo en D+5 en el programa de DGP en ciclos de FIV con ovocitos propios.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Para este trabajo se seleccionaron los ciclos de FIV con ovocitos propios en los que se realizó DGP en D+3 o en D+5 y transferencia sincrónica. Los embriones se cultivaron en medios de la serie G5Plus (Vitrolife). Para la biopsia en estadio de células se utilizó solución ácida de Tyrode, se aspiró un blastómero, mientras que para la

biopsia de trofotodermo se utilizó láser y aspiración de 2-3 células de media. Las transferencias de los embriones aptos y viables fueron en D+5 o D+6 respectivamente, siempre bajo control ecográfico y con catéter Wallace.

El análisis genético fue realizado por Reprogenetics-Spain. El análisis estadístico usado es Fisher Exact Test, $P < 0,05$.

RESULTADOS:

En el período descrito realizamos 40 ciclos de DGP, 22 de los cuales en estadio de células y los 18 restantes en estadio de blastocisto.

Los dos grupos de estudio no difieren en cuanto a edad (media de 35,6 versus 36,6 años), indicaciones (edad materna avanzada, factor masculino y abortos de repetición son las más frecuentes y en este orden para los dos grupos), media de embriones biopsiados (6,2 vs 6) por caso, ni en el número de casos cancelados por falta de embriones euploides (5 vs 4 para el grupo de biopsia en células y biopsia de trofotodermo respectivamente).

Sí que se detectan diferencias en el número medio de embriones euploides y en el porcentaje de gestaciones: para el grupo de embriones biopsiados en células, la media de embriones euploide

fue 1,3 de se obtuvieron 5 β hCG+ de 13 transferencias (38,5%); mientras que en el grupo de biopsia de trofotodermo, la media de embriones euploide fue de 2,3 y hubo 9 β hCG+ de 17 transferencias (52,3%).

La media de embriones transferidos fue similar (1,5 vs 1,4) pero el número de gestaciones no evolutivas fue el doble en el caso de la biopsia en estadio de células aunque los valores son pequeños (2 abortos en cada caso, 40% vs 22,2%).

CONCLUSIONES:

Como era de esperar, no hay diferencias en la población de pacientes porque se trata del mismo centro y de los mismos criterios de inclusión.

Sorprende que el número medio de embriones biopsiados sea similar en los dos grupos, cuando pensábamos que sería menor si se extendía el cultivo in vitro hasta D+5. En todo caso se trata de un indicador de las óptimas condiciones del desarrollo embrionario in vitro.

Nuestros datos reflejan mejores resultados del programa de biopsia de trofotodermo tanto en tasa de gestación como en evolución de las mismas. Pensamos que estas diferencias se deben sobre todo a la mayor calidad y potencial de los embriones en estadio de blastocisto.

P-117 VALOR PRONÓSTICO DEL ÍNDICE DE TERATOZOOSPERMIA Y MORFOLOGÍA EN LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL INTRAUTERINA

J. Suárez González, A. Pedredo Dugnot, M. Doussinague Ucin, P. Blanco Soto, B. Gaspar Herrero, M. Ardoy Vilches
Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid
julia.suarez.glez@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

La inseminación artificial intrauterina (IAI) consiste en la introducción y depósito del semen en el útero durante el periodo periovulatorio de un ciclo estimulado hormonalmente, constituye en la actualidad una de las primeras opciones terapéuticas de las parejas con problemas reproductivos.

La eficacia de IAI es variable dependiendo de muchos factores, destacando la calidad seminal.

OBJETIVOS:

Valorar la relación del índice de teratozoospermia (ITZ) y la morfología, previa y posteriormente a la capacitación espermática, con la gestación clínica.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se estudiaron 51 muestras de semen de varones que acudieron a la consulta de Reproducción Humana para realizar una IAI durante el año 2014.

Se obtuvo el ITZ y la morfología, según las normas de la OMS 2010, en la muestra de semen inicial y en la

muestra obtenida tras la capacitación espermática. La separación y capacitación de espermatozoides se realizó mediante gradiente de densidad.

La gestación clínica se definió como presencia de saco gestacional.

Se realizaron estadísticos de distribución, valoración de la normalidad, KruskalWallis, comparación de medianas, curva ROC, Chi cuadrado para normozoospermia (punto de corte definido por los criterios de la OMS 2010) en el programa SPSS.

RESULTADOS:

La edad media \pm DE de las mujeres sometidas a ciclos de IAI fue de 33 ± 3 años y la de los hombres 35 ± 4 .

De los 51 ciclos de IAI realizados, se obtuvo embarazo clínico en 9 de ellos. No se encontraron diferencias significativas entre el ITZ o la morfología entre los dos grupos de gestantes.

Grupo de pacientes que no lograron la gestación (n=42):

Media \pm DE del ITZ del semen fresco: $1,53 \pm 0,21$.

Media \pm DE del ITZ del semen IAI: $1,32 \pm 0,22$.

Media \pm DE de Morfología (%) del semen fresco: $5,97 \pm 4,14$.

Media \pm DE de Morfología (%) del semen IAI: $8,9 \pm 5,05$.

Grupo de pacientes que lograron la gestación (n=9):

Media \pm DE del ITZ del semen fresco: $1,38 \pm 0,11$

Media \pm DE del ITZ del semen IAI: $1,22 \pm 0,1$.

Media \pm DE de Morfología (%) del semen fresco: $5,28 \pm 3,14$.

Media \pm DE de Morfología (%) del semen IAI: $6,77 \pm 3,56$.

CONCLUSIONES:

En nuestra muestra no se evidencia capacidad predictiva de éxito ni del ITZ ni de la morfología, en concordancia con la bibliografía. El único valor que muestra cierta significación es el ITZ de la muestra de semen inicial.

P-118 COMPARACION DE RESULTADOS DE UNA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL FRENTE A DOS.

I. Ausin Hernandez (1), T. Ganzabal Areso (1), E. Garcia Castro (1), G. Gonzalez Iglesias (2), N. Argüello Soto (3), B. Navarro Santos (1), S. Quevedo Galván (1), A. Cearsolo Michelena (1), S. Larrea Zabala (1), C. Jiménez Viruega (1)
(1) Quirón Bilbao, (2) Master IVI, (3) Centro San Jose de Calasanz
iasuin.bil@quiron.es

INTRODUCCIÓN:

Históricamente en Quirón Bilbao se realizaban inseminaciones en dos

días consecutivos por ciclo de IA (inseminación artificial). A partir de 2013 se comenzó a realizar una inseminación por ciclo.

OBJETIVOS:

Nuestro objetivo es valorar si el cambio ha supuesto alguna modificación

significativa en cuanto a la tasa de embarazo en Inseminación Artificial Conyugal (IAC) e Inseminación Artificial de Donante (IAD).

MATERIAL Y MÉTODOS:

Este es un estudio retrospectivo que abarca desde 2012 hasta fecha de hoy. Se ha realizado estudiando 288 ciclos de IAC de los cuales 137 son de una inseminación y 152 de dos inseminaciones, y 266 ciclos de IAD 130 de una inseminación y 137 de dos inseminaciones.

Las pacientes que acudieron a la Unidad de Reproducción asistida a comenzar un ciclo de IAC tiene una edad media de $34,88 \pm 4,03$ y las mujeres que acudieron a ser tratadas con un ciclo IAD tiene una edad media de $35,43 \pm 3,98$.

Para realizar las inseminaciones tanto conyugales, como de donantes en un mismo ciclo se administraba HCG para desencadenar la ovulación entre 36 y 40 horas después. La primera inseminación se realizaba en el periodo pre-ovulatorio, y al día siguiente la segunda coincidiendo con el periodo post-ovulatorio.

En el protocolo actual, se administra HCG y se realiza la una inseminación el periodo post-ovulatorio.

RESULTADOS:

Las tasas de embarazo tanto en IAC como en IAD realizando una o dos inseminaciones son similares. Con una inseminación con semen conyugal se obtiene 21.89% frente a un 24.34% con dos; Con semen de donante un

24,61% frente a un 24.81% en una y dos inseminaciones respectivamente.

CONCLUSIONES:

Con los resultados obtenidos se puede afirmar que la realización de una inseminación es igualmente eficaz que dos inseminaciones en el mismo ciclo. De esta manera, el protocolo que actualmente utilizamos es más beneficioso para los pacientes al abaratar costes y disminuir sus inconvenientes.

P-119 LA CALIDAD DE LOS BLASTOCISTOS TRANSFERIDOS EN FRESCO ESTÁ RELACIONADA NO SOLO CON SU PROBABILIDAD DE IMPLANTAR SINO TAMBIÉN CON LA TASA DE ABORTO

P. Muñoz Soriano, E. Ferrer Robles, V. Antequera Durán, P. Ferrer Molina, M. Muñoz García, J. Blanes Espí, C. Calatayud Lliso, M. Ruiz Jorro
CREA (Medicina de la Reproducción), Valencia
patricia.munoz@creavalencia.com

INTRODUCCIÓN:

En muchas ocasiones el éxito de un programa de reproducción asistida o una técnica se mide por la tasa de implantación embrionaria. Prueba de ello es que la clasificación morfológica embrionaria de ASEBIR se basa en estos resultados. Los indicadores de éxito deberían ir más allá y analizar otras variables como el aborto, y lo que es más importante, parto y/o niño nacido sano.

OBJETIVOS:

Conocer en qué medida puede afectar la calidad de los blastocistos (criterio morfológico ASEBIR), no sólo a la

tasa de implantación, sino a los resultados obtenidos en un programa de reproducción asistida.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se analizaron los datos de 198 transferencias en D+5 en las que las calidades de los blastocistos fueron homogéneas (transferencias de 1 solo blastocisto o de 2 blastocistos con idéntica calidad). Se diferenciaron 4 grupos según dicha calidad: A (n=34), B (n=78), C (n=82) y D (n=4). Se compararon los resultados en tasa de implantación (TI), gestación clínica (TGC), aborto (TAB) y parto (TP) por transferencia. Se excluyeron ciclos con

DGP. El análisis estadístico se realizó mediante Chi-cuadrado. No se pudo incluir para este análisis comparativo el grupo D por el escaso número de casos en los que los dos blastocistos transferidos presentaban esta calidad.

RESULTADOS:

No se encontraron diferencias significativas entre blastocistos A y B: TI - 53,9% vs 45,5%, TGC - 55,9% vs 51,3%, TAB - 5,3% vs 12,5% y TP - 52,9% vs 43,6%, pero sí entre estos grupos y el de calidad C: TI - 28,1%, TAB - 31,3% y TP - 24,4%, excepto en la TGC (39,0%) posiblemente por el tamaño muestral.

CONCLUSIONES:

La probabilidad de parto por transferencia en fresco de blastocistos está relacionada con la calidad de dichos

blastocistos ya que la probabilidad de implantación se reduce y la de aborto se incrementa en blastocistos de peor calidad. Los indicadores de éxito de un programa de reproducción asistida

deben ir, por tanto, más allá de las tasas de implantación o de gestación, siendo imprescindible considerar parámetros como la tasa de aborto y la tasa de parto o de recién nacido vivo.

P-120 ANALISIS DE LA LONGITUD DE LA FASE S EN EL PRIMER Y SEGUNDO CICLO CELULAR EMBRIONARIO Y SU RELACION CON EL RESULTADO REPRODUCTIVO

J. Aguilar Prieto (1), E. Muñoz Muñoz (1), A. Galán (2), Y. Motato (2), M. Ojeda (1), V. Garcia (2), M. Meseguer (2)

(1) IVI VIGO, Vigo, Pontevedra, (2) IVI Valencia, Valencia.

jesus.aguilar@ivi.es

INTRODUCCIÓN:

La incorporación de nuevas variables de selección embrionaria basadas en las ventajas de la monitorización mediante time-lapse, ayuda en la decisión de qué embrión transferir, e incrementa el conocimiento de la biología embrionaria, sin comprometer la viabilidad de éste. Además de los tiempos exactos de división, y/o presencia de multinucleación y fragmentación celular, hay variables autocalculadas que se emplean en la selección embrionaria, como la longitud de los ciclos celulares o sincronía de éstos.

OBJETIVOS:

Analizar la longitud de la fase S (síntesis de DNA), en el primer ciclo celular (ECC1) y en cada blastómera del segundo ciclo celular (ECC2) de embriones con implantación conocida (KID), y relacionarla con el resultado reproductivo.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo observacional de 1679 embriones transferidos procedentes de 940 pacientes

sometidas a ICSI en el programa de donación de ovocitos entre enero de 2011 y enero de 2014 en las clínicas de IVI Vigo e IVI Valencia, cultivados en Embryoscope. Pacientes cuyas muestras seminales eran inferiores a un millón/ml fueron excluidas del estudio. Únicamente embriones no multinucleados con implantación conocida fueron analizados la longitud la fase S fue calculada como el periodo en que los pronúcleos o, los núcleos blastoméricos eran visibles, siendo ECC1 $S\text{-phase} = t_{PN\text{fading}} - t_{PN\text{appearance}}$, y ECC2 $S\text{-phase} = t_{2MONO1(f)} - t_{2MONO1(a)}$. El test ANOVA y χ^2 fueron los estadísticos empleados para determinar la influencia de la longitud de la fase S en la tasas de implantación.

RESULTADOS:

La fase S en ambos ciclos celulares fue calculada en 904 embriones KID de 1679, 32,74% (n=296) implantaron (KID+), y 67,25% (n=608) no implantaron (KID-). La longitud media de la fase S en ECC1 en embriones KID+ fue mayor que KID-, 15,50h v.s. 14,38h, y ligeramente más corta en ECC2, 8,35 en KID+ v.s. 8,60h en KID-. 46,1% (n=112) de los embriones implantaron, cuando la diferencia entre ambas fase S

fue mayor de 7.96h, siendo 29,1% para aquellos en que la diferencia fue entre 5,96h-7,95h; 23,1% para aquellos entre 3,61h-5,95h; y 30% para aquellos con una diferencia inferior a 3,6h.

CONCLUSIONES:

Los resultados muestran que la fase S del primer ciclo celular es casi el doble de larga que la del Segundo ciclo celular. Cuanto mayor es esta diferencia, mayor es la tasa de implantación embrionaria, sugiriendo que la replicación en el primer ciclo celular implica particularidades relacionadas con el fusión de los genomas y que aquellos embriones que no implantan puede que no completen la replicación de sus genomas durante el primer ciclo celular provocando una mayor reducción en la duración de la fase S en el segundo ciclo celular.

P-121 ¿MEJORA LA PROBABILIDAD DE GESTACIÓN CON IAD CUANDO UTILIZAMOS DONANTES DE SEMEN CON FERTILIDAD PROBADA?

N. Pérez Gallés, R. Alcolea Belloso, P. Martín Talavera, M. Domínguez Vega, A. Muntsant Soria, N. Fosas Sáenz, A. Carrasco Acosta, S. González García, F. Marina Rugero
Instituto de Reproducción CEFER, Barcelona
fernando@institutocefer.com

INTRODUCCIÓN:

La inseminación artificial con semen de donante (IAD) es una de las primeras técnicas usadas en reproducción asistida. Se realiza a mujeres sin pareja masculina o a parejas heterosexuales con factor masculino severo: azoospermia o fracaso de ICSI. A lo largo de los años se han ido introduciendo nuevas pruebas a los donantes para poder hacer una mejor selección. Uno de los requisitos que suelen pedir pacientes con ciclos fallidos de IAD-IU es que el donante tenga fertilidad probada.

OBJETIVOS:

En este estudio queremos comprobar si mejoramos la probabilidad de gestación en un ciclo de IAD si utilizamos un donante con fertilidad probada.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Los donantes son seleccionados entre estudiantes universitarios de 18 a 25 años. Se les realiza anamnesis personal y familiar, exploración física andrológica, analíticas para descartar enfermedades infecciosas y genéticas (VIH, VHC, VHB, sífilis, citomegalovirus y clamidia trachomatis), cultivo de semen, cariotipo, FISH en

espermatozoides para los cromosoma 13, 18, 21, X e Y y estudio molecular de la fibrosis quística. Se realiza un control post-descongelación de cada congelación. Sólo son aceptadas como muestras válidas las que al menos obtengamos una calidad post descongelación de cómo mínimo 20 millones de espermatozoides móviles por pajueta de 0,5 mL. La IAD-IU se realiza sobre ciclo estimulado con FSHr (Gonal®, Merck). Se utilizó una dosis inicial de 75 UI. El objetivo fue obtener de 1 a 3 folículos entre 17-20 mm. La inducción de la ovulación se realizó con 250 µg de hCGr (Ovitrelle®, Merck). La inseminación intrauterina se realiza a las 35-38 horas post-HCGr. En el caso de que no se consiguiera gestación en el primer ciclo, se asignaría un donante diferente en el siguiente ciclo.

Para el procesamiento de la muestra del donante, se descongelaron las pajuelas 4 minutos a 37°C. Se valoró recuento y movilidad espermática. Se realizaron gradientes de densidad y se centrifuga 20 minutos a 300g. Se lava el pellet con HTF/HSA centrifugando 10 minutos a 500g. Se valora recuento y movilidad. Se dejó la muestra en 0,5 mL de medio de cultivo en el incubador a 37°C hasta el momento de la inseminación.

RESULTADOS:

Se analizan retrospectivamente 430 ciclos de IAD-IU, 408 fueron realizados con donantes de fertilidad probada en el momento de la IAD y 22 con donantes sin fertilidad probada. Con los de fertilidad probada hubo 105 casos con gestación (25.7%) y con los de fertilidad no probada 6 (27.3%). ($p=0.872$).

CONCLUSIONES:

No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre el uso de donantes con fertilidad probada frente a donantes sin gestaciones previas. Podemos concluir que la selección previa realizada a los donantes y la calidad seminal mínima garantizada en las muestras de nuestro banco de semen hace innecesario el requisito de solicitar un donante con fertilidad probada. Si a pesar de los estrictos criterios de selección existiera un donante con baja tasa de fecundidad, se minimiza este efecto por el hecho de cambiar el donante sino se consigue gestación.

P-122 LOS NIVELES DE HORMONA ANTI-MÜLLERIANA (AMH) EN LÍQUIDO FOLICULAR NO SON ÚTILES PARA LA VALORACIÓN DE MADUREZ OVOCITARIA NI CALIDAD EMBRIONARIA INDEPENDIEMENTE DE LA RESERVA OVÁRICA DE LAS PACIENTES

C. Urda Muñoz, L. Melado Vidales, V. Badajoz Liébana, S. Camacho Fernandez-Pacheco, A.R. Díaz Corujo, J.A. Gragera Segura, M. Cañadas Gálvez, M. Alcaraz Pérez, J. Rodríguez Mesa, R. Bonache Abad
GINEFIV, Madrid
c.urda@ginefiv.com

INTRODUCCIÓN:

El éxito de un tratamiento de FIV/ICSI depende de múltiples factores, incluyendo la calidad ovocitaria. Sin embargo, la valoración morfológica del ovocito es difícil y aún más cuando se decide fertilización mediante FIV convencional. Es por esto que sería útil encontrar un indicador directo de viabilidad/calidad ovocitaria y de calidad embrionaria. El líquido folicular representa el microambiente donde el ovocito crece y se desarrolla y hasta el momento, no se ha podido demostrar correlación directa entre una hormona en líquido folicular, como el estradiol o la inhibina B, con alta fertilización ni con calidad del ovocito o del embrión. Las investigaciones publicadas con AMH en líquido folicular (LF) ofrecen hasta el momento resultados también contradictorios.

OBJETIVOS:

El objetivo de nuestra investigación es valorar una relación entre las concentraciones de AMH en líquido folicular con los resultados de la hiperestimulación ovárica controlada (HOC) para tratamientos de FIV/ICSI, madurez ovocitaria, tasas de fecundación y la calidad embrionaria.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Hemos realizado un estudio de cohortes, observacional y prospectivo, en el que se han recogido un total de 46 pacientes con diferentes reservas ováricas que se han sometido a un

ciclo de FIV/ICSI con protocolo corto de HOC que incluye antagonistas de la GnRH. Las pacientes han sido recogidas en nuestro centro durante un período comprendido entre marzo de 2012 y febrero de 2014. En el total de pacientes se han incluido 19 mujeres con síndrome de ovario poliquístico (PCOS) siguiendo los criterios internacionales de Rotterdam 2004; 16 pacientes normorrespondedoras, con ciclos regulares, ovulatorios, ovarios ecográficamente normales y niveles hormonales normales en analítica basal (TSH, prolactina, FSH, LH, estradiol); y 11 pacientes con baja reserva según los criterios internacionales del Consenso de Bologna 2011. El líquido folicular a analizar se recogió de uno de los folículos con mayor tamaño ecográfico en un tubo independiente al resto de líquidos foliculares, procurando la nula o mínima contaminación hemática el día de la punción ovárica. Los niveles de AMH de las muestras de líquido folicular se midieron con el sistema GEN II ELISA REF A79765 (Beckman Coulter, USA).

RESULTADOS:

La edad media (años \pm SD) fue 37,04 \pm 3,1; los grupos por reserva ovárica fueron homogéneos respecto a edad, IMC, antecedentes obstétricos y antecedentes de tratamientos de reproducción asistida. No se han hallado correlaciones entre el nivel de AMH en LF con respecto a los resultados de COH ni respecto a las hormonas basales de las pacientes como se presenta en la tabla siguiente:

CONCLUSIONES:

En nuestra investigación, no hemos encontrado una correlación significativa entre los niveles de AMH en líquido folicular y los parámetros de resultados para un ciclo de FIV/ICSI, por lo que no hemos podido demostrar la utilidad de los niveles de AMH en LF para la evaluación de calidad ovocitaria o embrionaria.

VARIABLES	AMH LF	
	<i>r</i> Pearson	<i>p</i>
EDAD	-0.124	ns
IMC	0,028	ns
RFA	0.162	ns
FOLIC >11MM	0.110	ns
DOSIS TOTAL FSH	0.077	ns
E2 DÍA hCG	-0.288	ns
OVOS OBTENIDOS	0.157	ns
OVOS MII	0.263	ns
TASA FERTILIZACIÓN	-0.180	ns
TQE	-0.07	ns

P-123 INCIDENCIAS EN LA TRANSFERENCIA Y TASA DE EMBARAZO

V. Masedo García, T. Rubio Asensio, C. Carrascosa Romero, C. López Martínez, E. López López
UR. HOSPITAL LA VEGA, Murcia
uravega@hospitallavega.es

INTRODUCCIÓN:

La transferencia embrionaria (TE) es el proceso mediante el cual transferimos a la paciente los embriones generados en el laboratorio de fecundación in Vitro (FIV). Después de la transferencia embrionaria, el éxito de la FIV dependerá de la capacidad del embrión para establecer el diálogo endometrio-embrión y que culmina con su implantación.

La técnica para la transferencia de embriones está basada más en habilidades profesionales que en parámetros científicos y objetivos. Actualmente se considera un paso esencial dentro de la FIV, en nuestro centro se realiza ecoguiada y sabemos que el aumento de resultados positivos de la FIV se debe entre otras causas a la mejora en el cuidado de la realización de la TE.

OBJETIVOS:

El objetivo de este estudio es valorar si existe un aumento en la tasa de embarazo en aquellas transferencias donde no existe ninguna incidencia según los criterios de inclusión establecidos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Este estudio retrospectivo se ha llevado a cabo entre los años 2012 y 2014. Los casos estudiados han sido un total de 444. Los criterios de inclusión fueron ciclos de ICSI realizados con ovocitos propios y donados, transferencias realizadas en un D+3 de cultivo donde al menos uno de los embriones

transferidos debía ser de calidad tipo A o B según los criterios de ASEBIR.

Se establecen 2 grupos Grupo A (n=277) pacientes con transferencias sin incidencias (SI) y grupo B (n=167) pacientes con transferencias con algún tipo de incidencia (CI). Dentro de este grupo se han diferenciado las siguientes incidencias: mala transmisión ecográfica, retención de embriones, sangrado en la cánula de transferencia y cambio de cánula de transferencia por canalización difícil.

Se estudia la tasa de gestación por transferencia y frecuencia del tipo de incidencia. Análisis estadístico con chi-cuadrado.

RESULTADOS:

De los 444 casos estudiados no se observaron incidencias en el 62%, en el 38% restante se observó al menos un tipo de las incidencias descritas. En las pacientes en las que no hubo incidencias (grupo A) se obtuvieron 108 embarazos resultando un 39% la tasa de gestación. En las que se produjo al menos una incidencia (grupo B), se obtuvieron 50 embarazos siendo la tasa de gestación del 30%.

Dentro del grupo B se observaron los siguientes porcentajes según el tipo de incidencia estudiada: mala transmisión ecográfica (30%) con una tasa de embarazo del 7%, retención de embriones (7%) con un tasa de embarazo del 2%, sangrado en la cánula de transferencia (51%) con una tasa de embarazo del 18%, cambio de cánula de transferencia por canalización difícil

(3%) con una tasa de embarazo del 1%, más de una incidencia en la misma transferencia (9%) con una tasa de embarazo del 2%.

CONCLUSIONES:

Se observa una tendencia a mejorar la tasa de gestación en las transferencias realizadas sin ninguna incidencia (39% vs 30%), aunque sin llegar a alcanzar criterio de significación estadística posiblemente por el número de casos estudiados. Si analizamos individualmente cada incidencia observamos que la tasa de embarazo disminuye considerablemente y todavía se reduce más si se da más de una incidencia a la vez.

Según la bibliografía el sangrado en cánula y la retención de los embriones dentro del catéter más de 120 segundos son los factores con peor pronóstico.

Nuestros resultados coinciden con todos los autores que describen que cualquier incidencia en la transferencia puede comprometer la implantación y con ello la gestación. Así pues queda clara la importancia de la técnica de la transferencia de embriones dentro del ciclo de FIV ya que de ella depende en parte el éxito final de todo el proceso.

BIBLIOGRAFÍA:

Embryo transfer: factors involved in optimizing the success.

Sallam HN.

Curr Opin Obstet Gynecol. 2005 Jun;17(3):289-98.

P-124 LA ASIMÉTRICA EMBRIONARIA EN DÍA 2 Y DÍA 3 DE DESARROLLO NO AUMENTA LA TASA DE ANEUPLOIDÍAS

H. Blanca Ordóñez (1), J. Ten Morro (1), A. Rodríguez Arnedo (1), MC. Tió Marquina (1), J. Guerrero Villena (1), MD. Díaz Martínez (1), I. Ochando Sánchez (2), L. Cascales Romero (1), J. Llácer Aparicio (1), R. Bernabéu Pérez (1)
(1) Instituto Bernabeu Alicante, (2) Instituto Bernabeu Albacete
jten@institutobernabeu.com

INTRODUCCIÓN:

La fragmentación y/o las divisiones asimétricas son parámetros morfológicos comunes observados en día 2 y día 3 de desarrollo embrionario. Existen estudios que sugieren que la asimetría del embrión afecta negativamente a la implantación y la tasa de embarazo debido al elevado porcentaje de aneuploidías encontradas en estos embriones. Por otro lado, existen evidencias de que los criterios morfológicos empleados en los primeros días del desarrollo son imprecisos, por lo que el cultivo largo y la selección en estadio de blastocisto incrementan las posibilidades de implantación.

OBJETIVOS:

Determinar si existe una relación entre la asimetría embrionaria en día 2 y día 3 de desarrollo embrionario y la tasa de aneuploidías observada tras la biopsia de los embriones en fase de blastocisto.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se analizó retrospectivamente un total de 559 embriones (Enero 2014-Abril 2015) en estadio de blastocisto,

biopsiados en día 5 y 6 de cultivo para realización de CCS (Comprehensive Chromosome Screening).

Para la medida de la asimetría embrionaria se empleó el programa Cronus 3.7 (Research Instruments Ltd.). Se consideró un embrión asimétrico si el diámetro del blastómero mayor y menor difirió en más de un 20% (Hardarson et al., 2001). Para determinar el efecto de la asimetría sobre la tasa de aneuploidía, se analizaron aquellos embriones con número par de células y que presentaron asimetría tanto en día 2 como en día 3 de cultivo. El tratamiento de los datos se hizo mediante la Prueba de Chi-Cuadrado de Pearson, mediante el programa SPSS (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTADOS:

Del total de 559 embriones analizados mediante CCS, 544 fueron simétricos en día 2 y 3. Del total de embriones simétricos, 243 resultaron alterados cromosómicamente (44,7%) mientras que 301 presentaron una dotación cromosómica normal (55,3%). Se obtuvieron 15 embriones con asimetría y número par de células en día 2 y 3.

De ellos, se obtuvo que 7 resultaron alterados cromosómicamente (46,7%) y 8 tenían una dotación cromosómica normal (53,3%). No se alcanzó significación estadística ($P=0,540$) entre la tasa de aneuploides observados en embriones simétricos y embriones asimétricos con número par de células.

CONCLUSIONES:

Los embriones asimétricos en día 2 y día 3 de desarrollo tienen tendencia a formar blastocistos de baja calidad en día 5 de desarrollo. Aquellos que consiguen evolucionar y dar lugar a blastocistos de buena calidad, y que por tanto serán susceptibles de biopsia embrionaria, tendrán la misma tasa de aneuploidías que los embriones simétricos observados en día 2 y día 3 de cultivo embrionario.

BIBLIOGRAFÍA:

Hardarson, T., Hanson, C. Sjögren, A. y Lundin, K. (2001) Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum. Reprod.*, 16, 113-318.

P-125 NUESTRA EXPERIENCIA CON LA CORIFOLITROPINA-ALFA (ELONVA®) EN LOS TRATAMIENTOS DE FIV

C. Álvarez Lleó, C. García Garrido, M. Sánchez Toledo, M. Resta Serra, G. González De Merlo
Hospital General Universitario de Albacete, Albacete
cristina10lleo@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

La corifolitropina-alfa es una hormona recombinante con efecto sostenido en su acción foliculo-estimulante, que

reduce la complejidad y la duración de los tratamientos de FIV. Está indicada para la estimulación ovárica controlada en combinación con un antagonista de la GnRH, para el desarrollo folicular

múltiple. La administración de una dosis única al comienzo de la fase folicular, inicia y mantiene un desarrollo folicular múltiple durante 7 días, evita la administración diaria de

gonadotropinas y reduce la ansiedad de las pacientes.

OBJETIVOS:

Mostrar los resultados de nuestra experiencia en el uso de Corifolitropina-alfa (Elonva®, laboratorios MSD) durante la hiperestimulación ovárica controlada (HOC) en protocolo con Ant-GnRH.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se iniciaron 49 ciclos de FIV (edad 32,78 ± 2,62 años) correspondientes a 41 pacientes que comenzaron la HOC con 150 microgramos de corifolitropina-alfa y dosis variables de otras FSH (FSHr, FSHu) o HMG en protocolo con Ant-GnRH.

Las pacientes tratadas mostraban diversos problemas de esterilidad, excluyéndose aquellas con antecedentes de SHO, SOP o con >20 folículos antrales.

La estimulación se inició el día 2-3 del ciclo, con 150 microgramos de corifolitropina-alfa. A partir del día 7, se continuó el tratamiento con FSH o HMG en dosis variables en función de la respuesta folicular.

Desencadenamos la ovulación con folículos 17-20 mm. Tras la punción, se realizó la ICSI, siguiendo los protocolos de nuestro laboratorio.

RESULTADOS:

Las causas de esterilidad fueron: factor masculino (n=15), reserva ovárica disminuida (ROD) (n=10), factor tubárico (n=13), anovulación (n=3), factor ovárico (n=2), esterilidad de origen desconocido (4), factor cervical (n=1) y endometriosis (n=1). De los 49 ciclos, 41 tuvieron transferencia embrionaria. Las causas de no transferencia embrionaria en los otros 8 ciclos iniciados fueron: cancelación por riesgo de hiperestimulación ovárica (n=1) (2,0%), no recuperación ovocitaria (n=1) (2,0%), ovocitos inmaduros (n=1) (2,0%) y fracaso de fecundación (n=4) (8,16%), dos "factor masculino severo" y dos ROD en los que sólo se obtuvo un ovocito.

El número medio de ovocitos recuperados fue 7,83±4,36, de maduros 6,30±3,93 y el número medio de embriones transferidos 1,85±1,42. Se consiguieron 10 embarazos clínicos: 5 (factor masculino), 1 (factor tubárico), 2 (anovuladoras), 1 (endometriosis) y 1 (ROD). La tasa de implantación fue 15,78%. De los 10 embarazos, uno

fue un aborto, tres fueron gestaciones dobles y seis únicas, finalizando las 9 con recién nacido vivo en casa.

CONCLUSIONES:

La corifolitropina-alfa simplifica los tratamientos durante la HOC consiguiéndose resultados comparables al de otras FSH cuando se utiliza en pacientes anovuladoras y en normorrespondedoras.

BIBLIOGRAFÍA:

- Decler W, Osmanagaoglu K, Meganck G, Devroey P. A new approach for ovarian stimulation in IVF using Corifollitropin Alfa in combination with GnRH analogues to trigger final oocyte maturation. A pilot study. Facts Views Vis Obgyn. 2014;6:159-65.

- Marde"i" T, Mannaerts B, Abuzeid M, Levy M, Witjes H, Fauser BC; Engage investigators. Short follicular phase of stimulation following corifollitropin alfa or daily recombinant FSH treatment does not compromise clinical outcome: a retrospective analysis of the Engage trial. Reprod Biomed Online. 2014; 28:462-8.

P-126 EFECTO DE LA PLACA DE CULTIVO Y TIPO DE INCUBADOR UTILIZADOS EN LA RECUPERACION DE LA TEMPERATURA DE LAS MICROGOTAS DE MEDIO DE CULTIVO.

I. Vanrell Barbat, E. Mestres Gonzalvo, M. Garcia Jiménez, N. Costa Borges, G. Calderón De Oya
Embryotools, Barcelona
lab@embryotools.com

INTRODUCCIÓN:

Durante la manipulación en campanas de flujo laminar calefactadas, la temperatura de las gotas de medio de cultivo puede disminuir hasta valores cercanos a los 34°C en pocos minutos. La temperatura de las microgotas no volverá a sus valores normales hasta cierto tiempo después de haber sido devueltas al interior del incubador.

Este tiempo de recuperación puede ser crítico para el desarrollo embrionario y variar dependiendo de varios factores, incluyendo el sistema de cultivo o tipo de incubador utilizados, entre otros. Actualmente, disponemos de 2 tipos de incubadores para el cultivo de gametos y embriones humanos: incubadores convencionales de gran volumen y mini-incubadores, o benchtop.

OBJETIVOS:

Valorar el tiempo que tardan las microgotas de medio de cultivo en recuperar la temperatura óptima para el cultivo de gametos y embriones humanos en dos tipos de placas con dos distribuciones de microgotas y en dos tipos de incubadores.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se prepararon placas de cultivo de 60mm (NUNC) y placas embryo GPS® (LifeGlobal) con microgotas de 50µl de medio de cultivo cubiertas por 14ml de aceite LifeGuard® (LifeGlobal). Así como en las placas embryo GPS® la distribución de las gotas está pre-definida, en las placas NUNC la distribución de las microgotas se realizó de dos formas distintas: periférica y central.

Los tres tipos de placas se calentaron en un incubador durante al menos 24 horas a 37,3°C. Posteriormente, se dejaron enfriar en una superficie calefactada a 37°C hasta que la temperatura de las microgotas descendió a 34°C±0,5°C. En ese momento, se devolvieron al interior de un incubador convencional (Heracell 150i) o de un incubador benchtop (K-MINC®, COOK). La temperatura de la microgota se registró cada 30 segundos durante 30 minutos con una sonda de temperatura (Fine Gauge Thermocouple (±0,01°C), OKOLAB) sumergida en una de las gotas de cultivo. Se realizaron dos replicas para cada placa. Para comprobar la estabilidad de los incubadores, se

registró la temperatura de la superficie calefactada mediante sondas externas de temperatura (iButtons (±0,07°C), Thermodata), colocadas en la zona contigua a la placa de cultivo.

RESULTADOS:

La temperatura de la superficie contigua al lugar donde se colocaban las placas de cultivo en los incubadores fue de 37±0,2°C.

Los tres modelos de placas tuvieron curvas de aumento de la temperatura similares entre ellos. En cambio, la recuperación de temperatura fue muy diferente según el incubador donde se hallaban.

Para alcanzar una temperatura de 36,5°C en el incubador convencional, las gotas de las placas embryo GPS® y de las NUNC con distribución de microgotas periférica tardaron 17 min. y las placas NUNC con distribución central tardaron 18 min. En el incubador benchtop, las microgotas en las placas embryo GPS® y en las placas NUNC con distribución periférica tardaron 6 min en alcanzar la misma temperatura. En las placas NUNC

con distribución central tardaron 5,5 min.

En el incubador convencional las microgotas alcanzaron una temperatura máxima y estable de 36,8°C al cabo de 29 minutos, sin llegar en ningún momento a 37°C. Sin embargo, en el incubador benchtop las gotas habían alcanzado una temperatura estable de 37°C a los 10 minutos, independientemente de la distribución o tipo de placa utilizada.

CONCLUSIONES:

En nuestro estudio, los incubadores benchtop parecen más eficientes en la recuperación de la temperatura de las microgotas que los incubadores convencionales. El diseño de las placas de cultivo y la distribución de las microgotas no parecen influir en el tiempo de recuperación de la temperatura en ninguno de los dos tipos de incubadores.

P-127 ANÁLISIS DE EFICACIA DEL SISTEMA PRIMOVISION

FJ. Prados Prados, G. Pérez Bermejo, A. Díaz Morales, A. Fuertes Huerta, V. Santos García, L. Belizón Alcedo, I. Bruna Catalán
Hospital Universitario Madrid Montepíncipe. Boadilla del Monte, Madrid
fernandojprados@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

La evaluación embrionaria mediante tecnología Time-Lapse se está extendiendo en los laboratorios de FIV. En nuestro centro hemos iniciado recientemente su utilización en la práctica clínica mediante el sistema Primovision.

OBJETIVOS:

Conocer la eficacia de la selección embrionaria mediante Time-Lapse en comparación con el sistema de evaluación morfológico tradicional.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se estudiaron ciclos de FIV realizados en nuestro centro entre febrero de 2014 y marzo de 2015.

Los embriones procedieron de ovocitos de mujeres menores de 39 años. No se incluyeron ciclos de ovodonación. En casos de cancelación de la transferencia en fresco se incluyó la primera descongelación embrionaria. Con Primovision se evaluaron los embriones para 41 transferencias.

De estos casos, en 19 hubo más de 2 embriones A-B entre los que se hubo de

realizar selección embrionaria para la transferencia (Grupo P) Este grupo se comparó con 28 transferencias de casos similares durante el mismo periodo cuyos embriones se cultivaron en el mismo incubador pero en los que no se utilizó Primovision (Grupo NoP).

RESULTADOS:

De las 41 transferencias en las que se utilizó Primovision para seleccionar embriones en pacientes de <39 años se obtuvieron 21 gestaciones clínicas (51,2%). En estas transferencias se utilizaron 66 embriones de los cuales implantaron 27 (40,9%).

En el Grupo P se obtuvo una tasa de gestación por transferencia del 63,2% (12/19) frente a un 71,4% en el Grupo NoP (20/28).

La tasa de implantación en el Grupo P fue del 46,7% (14/30) y en el Grupo NoP del 55,3% (26/47) Ninguna diferencia fue estadísticamente significativa.

CONCLUSIONES:

Los datos sugieren que el sistema de evaluación embrionaria Time-Lapse nos permite seleccionar embriones capaces de implantar con una excelente eficacia.

En los casos incluidos en este estudio en los que se dispuso de

suficientes embriones de buena calidad morfológica embrionaria, los embriones se seleccionaron utilizando Primovision con una eficacia similar a la conseguida mediante evaluación morfológica tradicional.

P-128 LA ACTIVACIÓN DE LA AMPK POR A769662 REGULA LA MOTILIDAD DEL ESPERMATOZOIDE HUMANO

V. Calle Guisado, L.J. García Marín, MC. Gil Anaya, J. Mijares, MJ. Bragado González, IS. Álvarez
Universidad de Extremadura
vcallegu@alumnos.unex.es

INTRODUCCIÓN:

La proteína quinasa activada por AMP o AMPK, es una Ser/Thr quinasa que actúa como una molécula sensora del metabolismo celular presentando una extremada sensibilidad a su efector alostérico AMP, ya que cualquier aumento en el ratio AMP/ATP (que indica un descenso de la carga energética celular), provoca la activación de la AMPK. La célula germinal masculina posee una elaborada compartimentación celular que provoca que, en la última fase de su desarrollo, no pueda llevar a cabo ni la transcripción ni la traducción y, consecuentemente, el espermatozoide maduro es incapaz de sintetizar proteínas. Por todo ello, las rutas de señalización intracelular que regulan los procesos celulares basadas en las modificaciones postraduccionales de las proteínas pre-existentes, como la fosforilación de proteínas, catalizada por enzimas quinasas, son especialmente relevantes en el espermatozoide. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha descrito que la AMPK se expresa en el espermatozoide de cerdo y se encuentra enzimáticamente activa en condiciones fisiológicas. Por otra parte, nuestros resultados demostraron que la actividad fisiológica de la AMPK en el espermatozoide de cerdo es imprescindible para lograr una óptima motilidad que sea la adecuada ante las diferentes condiciones extracelulares a las que esta célula germinal se encuentra sometida.

OBJETIVOS:

El objetivo de este trabajo es investigar el posible papel de la AMPK en la regulación de la motilidad del espermatozoide humano.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Eyaculados procedentes de 4 donantes normozoospermicos (18-40 años) fueron lavados en un gradiente 80/40 de partículas de sílice (SpermFilter®) y centrifugados a 300g durante 20min obteniéndose una muestra de espermatozoides con una motilidad de al menos el 80%. Tras la centrifugación las muestras se diluyeron en tampón SpermWashing Medium (HSA 5.0 mg/ml, Irvine Scientific, CA, USA) a una concentración final de 20×10^6 espermatozoides mL⁻¹. Los espermatozoides se incubaron en presencia o ausencia de DMSO (0,1%) ó el activador farmacológico de AMPK, A769662 (100µM) a 37,5°C con 5% CO₂. La motilidad de las muestras se determinó en cámara Makler® a los 5, 60, 120 y 180 min y posteriormente se analizó con el sistema de análisis de motilidad espermática por ordenador ISAS (Projectes i Serveis R+D, SL; Valencia, Spain). Los parámetros de motilidad estudiados fueron: porcentajes de espermatozoides móviles progresivos, no progresivos, e inmóviles (según la OMS), la VCL (velocidad curvilínea, µm/s), la VSL (velocidad rectilínea en µm/s), la VAP (velocidad media, in µm/s), LIN (coeficiente de linealidad en

%), STR (coeficiente rectitud%), ALH (amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza en µm), WOB (coeficiente de tambaleo en %) y BCF (frecuencia de batida de la cola en Hz).

RESULTADOS:

En nuestras condiciones la adición de un 0,1% de DMSO no tuvo efectos significativos en ninguno de los parámetros de motilidad a los diferentes tiempos estudiados. La incubación de los espermatozoides en presencia del activador de la AMPK, A769662 (100µM), produce una disminución generalizada de la motilidad del espermatozoide humano.

Concretamente provoca una disminución significativa en el porcentaje de espermatozoides móviles a todos los tiempos estudiados con un mayor efecto a los 180min (66,2±11,7% vs 55,9±13,2%). Por otra parte, la activación de la AMPK en espermatozoides humanos reduce de forma significativa todas las velocidades, VCL, VAP y VSL a todos los tiempos estudiados.

CONCLUSIONES:

La activación de la proteína quinasa AMPK reduce los principales parámetros de motilidad en el espermatozoide humano.

P-129 ¿CÚAL ES EL TIEMPO ÓPTIMO ENTRE LA DESVITRIFICACIÓN Y LA TRANSFERENCIA?

S. Atienza de Nava, JA. López Ayala, M. Fernández Díaz, B. Arnott Fernández, I. Arnott Fernández, A. Gayo Lana
FIV4. Instituto de Reproducción Humana, Gijón, Asturias
saraatienza@fiv4.es

INTRODUCCIÓN:

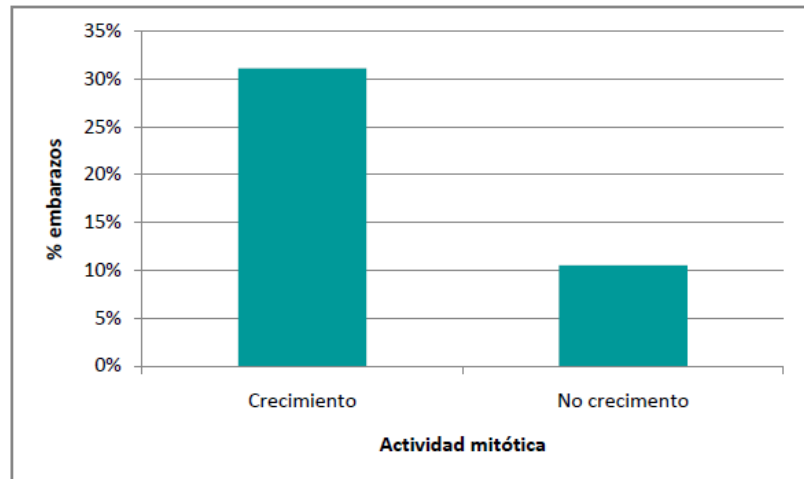
La sincronización materno-embriónica incrementa las tasas de embarazo en los protocolos de criotransferencia, pero, ¿cuál es el tiempo óptimo entre la desvitrificación y la propia criotransferencia? Partimos de la base que se requiere un tiempo mínimo de 2-5 horas para que estructuras del citoesqueleto celular se vuelvan a repolimerizar tras la desvitrificación. También es de destacar que un cultivo largo nos permite observar la actividad mitótica del embrión, considerada como el crecimiento de al menos una blastómera tras la desvitrificación, si bien la ausencia de dicho crecimiento durante las horas de cultivo de nuestro estudio (máximo de 20 horas) no garantiza que dicho embrión esté parado. En contraposición, tiempos de cultivos prolongados tras desvitrificación someten a los embriones a un estrés innecesario.

OBJETIVOS:

- Establecer la tasa de embarazo en función del tiempo transcurrido entre la desvitrificación y la transferencia.
- Relacionar la reanudación de la actividad mitótica con la tasa de embarazo.

MATERIAL Y MÉTODOS:

- Estudio retrospectivo con N=80 criotransferencias de embriones de día 2 ó 3.
- Edad media: $36,27 \pm 0,80$ años (máx 48, mín 31 años).
- Se agrupan los pacientes en dos grupos:
 - Grupo A: cultivo corto tras



Gráfica 1.

desvitrificación (? 5 horas) N=61.

- Grupo B: cultivo largo tras desvitrificación (12-20 horas) N=19.
- Media de embriones transferidos: 1,4.
- Preparación endometrial: ciclos sustituidos y ciclos naturales.
- En cultivo largo se analiza la actividad mitótica del embrión como incremento de al menos una blastómera.

La significación estadística se ha realizado mediante Test de la t-Student para datos independientes, considerando significativos los valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS:

La tasa de supervivencia tras desvitrificación fue del 98 %. Cuando se analizó la tasa de embarazo en comparación con la preparación endometrial, no hubo diferencias significativas entre ambas variables, ni en ambos grupos.

Aunque no hay diferencias significativas en las tasas de embarazo entre ambos

grupos, sí podemos observar una ligera tendencia en el incremento de la tasa de embarazo a favor del grupo A (Gráfica 1).

Analizando ambos grupos en conjunto el 36 % (29/80) de los embriones mostraron actividad mitótica, representada por el incremento de al menos una blastómera. Con una tasa de embarazo del 48% (14/29). En el resto de los casos, a pesar de no mostrar dicho incremento, produjo embarazo en el 14% de los casos (7/51)(Tabla 1).

CONCLUSIONES:

Aunque hemos encontrado una tendencia en las tasas de embarazo a favor del cultivo corto tras la desvitrificación frente al cultivo largo, si bien no fue estadísticamente significativa, nos parece que el cultivo corto es la opción a elegir ya que es innecesario someter a los embriones a tiempos más largos de cultivo tras la desvitrificación, permitiendo en cada equipo de trabajo, gestionar de una forma más rápida la rutina del laboratorio.

En cuanto a la actividad mitótica y la tasa de embarazo, si bien existe

	Preparación endometrial			Crecimiento antes de transferencia			Tipo de cultivo			Edad		
	Ciclo sustituido	Ciclo natural	p	Crece	No crece	p	Corto	Largo	p	Media	Mínimo	Máximo
Embarazo	15	6	0,77	14	7	0,001	19	2	0,133	34,3	31	42
No embarazo	45	14		15	44		42	17		37,0	31	48
Total	60	20	80	29	51	80	61	19	80	36,3	31	48

Tabla 1.

una significación entre ellas, cabe la pena destacar que un 14% embriones que no mostraron una actividad mitótica durante las 5 primeras horas,

fueron capaces de dar embarazo, lo que demuestra que no deben ser descartados para la transferencia.

P-130 ESTUDIO PILOTO PROSPECTIVO PARA EVALUAR LA UTILIDAD DEL USO DE PARCHES DE TESTOSTERONA EN PACIENTES CON BAJA RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA PREVIA

Vanesa Díaz Prado, A. Clavero Gilabert, B. Romero Guadix, S. Ruiz Durán, M. López Regalado, M. Luengo Díaz, P. Nabas Bastida, I. Sánchez Castelló, A. Guzmán Olmedo, L. Martínez Granados
Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada
vanesadiazprado@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

El tratamiento en pacientes pobres respondedoras a la estimulación ovárica con unos niveles basales de FSH normales sigue siendo uno de los retos más difíciles de la medicina reproductiva. Varios estudios han demostrado sinergismo entre los andrógenos y FSH, pudiendo ser de utilidad su uso como coadyuvante en el tratamiento de la baja respuesta.

OBJETIVOS:

Estudiar y evaluar la utilidad de un tratamiento previo mediante parches de testosterona en pacientes bajas respondedoras.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio prospectivo que incluyó 20 mujeres infértiles que tenían un primer ciclo de tratamiento FIV/ICSI con mala respuesta de acuerdo a los criterios de Bolonia. En el segundo intento de FIV/ICSI, todas las pacientes recibieron tratamiento con testosterona

transdérmica (30 mg al día) durante los 5 días previos al tratamiento con gonadotropinas. Los resultados se compararon con los obtenidos en el ciclo previo de estas mismas pacientes, para evaluar el efecto del nuevo tratamiento. Los datos fueron analizados por el paquete estadístico SPSS.

RESULTADOS:

La edad media de los pacientes fue de 35 ± 3 años. El IMC promedio fue $23,6 \pm 3,2$. El tiempo medio de la infertilidad era más de $3,8 \pm 2,57$ años. Las concentraciones de FSH basal fue de $8,5 \pm 2,9$ UI / L. La causa de la infertilidad era un 25% por factor femenino (endometriosis, factor tubárico, fibroma uterino), un 30% por factor masculino y un 45% por causas desconocidas. Los niveles séricos de estradiol en el día de la hCG fueron significativamente mayores en el ciclo con testosterona (816 vs 1.486 pg/ml, $p=0,036$). La dosis media de FSH administrada fue así mismo significativamente mayor en el ciclo con testosterona (3,395 vs 2,521 UI;

$p=0,01$). El número de folículos de más de 17 mm, ovocitos maduros y embriones de mayor calidad tiende a ser mayor en el ciclo con testosterona, pero sin alcanzar una significación estadística. Se observó mayor tasa de embarazo (10% vs 35%) y menos ciclos cancelados (30% vs 20%) usando parches de testosterona, pero no se alcanzó significación estadística.

CONCLUSIONES:

El tratamiento previo con testosterona transdérmica puede mejorar la sensibilidad ovárica a la FSH y la respuesta folicular del tratamiento con gonadotropinas en pacientes de FIV con baja respuesta ovárica. Sería necesario realizar estudios multicéntricos, para elevar el tamaño de muestra, lo que permitiría confirmar la posible eficacia del tratamiento con testosterona transdérmica en pacientes con baja respuesta a la estimulación en TRA.

P-131 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA PREPARACIÓN ENDOMETRIAL EN LA TASA DE IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA EN OVODONACIÓN

B. Navarro Santos (1), T. Ganzabal Areso (1), E. Garcia Castro (2), I. Ausin Hernandez (1), S. Quevedo Galván (1), S. Larrea Zabala (1), G. Gonzalez Iglesias (3), N. Argüello Soto (4), C. Jiménez Viruega (1)
(1) Quirón Bilbao, (2) Master SEF, (3) Master IVI, (4) Centro San José de Calasanz
andrologia.bil@quiron.es

INTRODUCCIÓN:

La donación de ovocitos es una técnica que tiene buenos resultados en el sector poblacional que presenta peor pronóstico reproductivo.

Un factor crucial para la implantación embrionaria en el proceso de la transferencia, es sincronizar la preparación endometrial en la receptora con el desarrollo de los embriones. Debe existir un tiempo adecuado de preparación endometrial que consiste en la optimización de su receptividad, conocida como "ventana de implantación", caracterizada por la aparición de los receptores de la progesterona y que manifiesten la transformación de un endometrio proliferativo en uno receptivo.

Para conseguir la sincronización endometrial de la receptora, anteriormente se utilizaban protocolos de larga duración hasta la obtención de al menos 1 embrión viable. Respecto a esto, son varios los investigadores que han concluido que los protocolos de larga duración (hasta a 70 días de preparación) conllevan una disminución en la tasa de embarazo, ya que se asocian a sangrados y disrupción endometrial. En el protocolo actual no es necesario realizar dicha sincronización debido al ventajoso protocolo de vitrificación implantado en el centro, realizando una preparación endometrial inferior a 20 días.

La preparación endometrial artificial se realiza mediante la administración de valerato de estradiol por vía oral con una dosis de 6mg/día desde el día 2 del ciclo menstrual (con o sin supresión hipofisaria previa) y que se continúa

hasta el día de la punción folicular de la donante o sino durante 13-15 días en el caso de embriones vitrificados. Tras comprobar que el grosor endometrial oscila entre los 7 y 10 mm mediante control ecográfico, se inicia la administración de progesterona, a una dosis de 200 mg tres veces al día durante 72-120 horas dependiendo del desarrollo del embrión o embriones a transferir. La toma de estradiol y progesterona se continúa hasta la décima semana de gestación.

Con este trabajo se pretende analizar la influencia de la disminución del tiempo en la preparación endometrial de la receptora en la tasa de embarazo.

OBJETIVOS:

El objetivo de este trabajo es analizar qué preparación endometrial es la más adecuada en pacientes receptoras de ovocitos que se someten a una transferencia embrionaria en fresco frente a las que lo realizan en diferido.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Este estudio se ha realizado en la Unidad de Reproducción Asistida del Grupo Hospitalario Quirón Bilbao analizando las pacientes que acuden a un tratamiento de recepción de ovocitos, con un total de 166 pacientes con una edad comprendida entre los 31 y 48 años, divididas a su vez, en 2 grupos: Grupo A (80), pacientes con preparación endometrial sincronizada para una posterior transferencia embrionaria en fresco; y el Grupo B (88) con preparación más corta con transferencia en diferido de embriones vitrificados.

RESULTADOS:

Las tasas de embarazo en ciclos del Grupo A y B son similares con un 40% y un 38% respectivamente, teniendo en cuenta TE1 + TE1 frente a TE2.

CONCLUSIONES:

El protocolo implantado en el centro es el adecuado debido a que la tasa de embarazo sea similar, conlleva una mayor comodidad para la paciente porque supone menos días de preparación endometrial (menos medicación) y así evitamos el riesgo de disrupción endometrial y envejecimiento decidual.

BIBLIOGRAFÍA:

(Almeida, y otros, 2004) (Zhu, y otros, 2011) (Roque, y otros, 2013) 9.

(Zhu, y otros, 2011) (El-Toukhy, y otros, 2008).

(Almeida, y otros, 2004) (Diedrich, Fauser, & Griesinger., 2007).

6. Margalioth, Ben-Chetrit, Gal, Eldar-Geva. Investigation and Treatment of repeated implantation failure following FIV-TE. Human Reproduction 2006. 21(12):3036-3043.

P-132 INFLUENCIA DE LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA Y DEL REM EN LOS RESULTADOS DE IAC

G. Bueno Rodríguez, S. Delgado Muñoz, J. León Tovar, F. Martínez Cortés, A. León Justel
Complejo Hospitalario Universitario de Huelva, Huelva
guadalupe_bueno@yahoo.com

INTRODUCCIÓN:

La Inseminación Artificial Conyugal (IAC) es ampliamente usada en parejas en tratamientos de infertilidad por ser una técnica sencilla, económica y bien aceptada. Es el primer tratamiento empleado antes de recurrir a técnicas más invasivas y costosas. La tasa de gestación en IAC difiere de unos estudios a otros en función de los criterios empleados: selección de los pacientes, causa de la infertilidad, método de estimulación ovárica, número de ciclos realizados, parámetros seminales y técnicas de preparación. El valor pronóstico de los parámetros seminales en los resultados de IAC es todavía objeto de debate.

OBJETIVOS:

El objeto de nuestro estudio fue valorar la influencia de la morfología espermática en el semen analizado en fresco y del número de espermatozoides progresivos recuperados (REM) tras técnicas de capacitación seminal en los resultados en ciclos de IAC. Valorar también la influencia de la edad de la mujer en los resultados de IAC.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Es un estudio retrospectivo desde Enero de 2013 hasta Enero de 2015, en donde se realizaron 271 ciclos de IAC en un total de 123 parejas. Todos los ciclos se realizaron tras tratamiento de estimulación ovárica controlada con FSH o HMG, desencadenándose la ovulación con hCG cuando había al menos un folículo mayor de 18 mm. La inseminación se realizó a las 36h ± 3h tras la inyección de hCG. Todos los ciclos fueron monitorizados con ecografía transvaginal. El análisis del semen se realizó según criterios del Manual OMS 2010. La técnica de capacitación

seminal utilizada fue swim-up empleándose para ello medio de cultivo PureSperm® Wash (NIDACON).

RESULTADOS:

Se obtuvieron 30 embarazos clínicos, dando una tasa de gestación clínica / ciclo de 11,07 % y por pareja del 24,39%. Se establecieron 5 grupos de REM: grupo 1 (REM < 5 millones), grupo 2 (REM 5-10 mill), grupo 3 (REM 10-20 mill), grupo 4 (REM 20-40 mill) y grupo 5 (REM > 40 mill). Cuando el REM es < 5 millones no se consigue embarazo y observamos que la tasa de embarazo aumenta con el REM hasta que éste es de 40 millones, por encima de éste umbral no mejoran los resultados. No obstante, no existen diferencias significativas en las tasas de embarazo entre todos los grupos de REM establecidos. Para la morfología se establecieron 5 grupos: grupo 1 (FN < 4%), grupo 2 (FN 4-7%), grupo 3 (FN 7-10%), grupo 4 (FN 10-14%) y grupo 5 (FN > 14%). Cuando la morfología es inferior al 4% de formas normales no se consigue embarazo y no hay más embarazos conforme mejora la morfología, de hecho, la mayor tasa de embarazos obtenida se consigue cuando la morfología es del 4-7%. Las mujeres se agruparon por edad: grupo 1 (< 30 años), grupo 2 (30-33), grupo 3 (33-36), grupo 4 (36-

39) y grupo 5 (> 39); observamos que conforme aumenta la edad disminuyen las posibilidades de éxito, siendo éste mayor en el grupo de edad < 30 años, aunque no se encuentran diferencias significativas con respecto a los demás grupos. Por encima de 39 años no se consigue embarazo, aunque éste grupo es muy reducido.

CONCLUSIONES:

Nuestros resultados muestran que un mínimo de 5 millones de espermatozoides deben ser inseminados y la morfología espermática ser mayor del 4% para poder ofrecerle a nuestras parejas posibilidades de éxito en IAC. Por debajo de éstos límites deberíamos recomendar fecundación in Vitro (FIV). A su vez, cuanto más joven sea la mujer mayores posibilidades de éxito tiene la IAC.

BIBLIOGRAFÍA:

- Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y la interacción entre el semen y el moco cervical. Edición 2010.
- Ahmed Badawy, M.D., AbouBakr Elnasharm M.D., Mohamed Eltonogy.

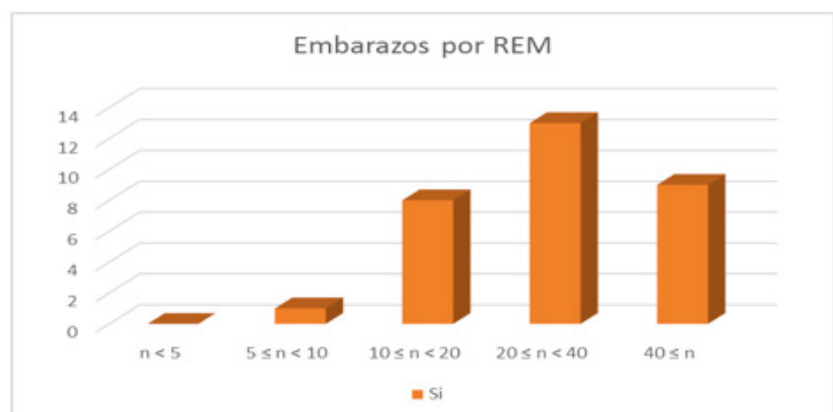
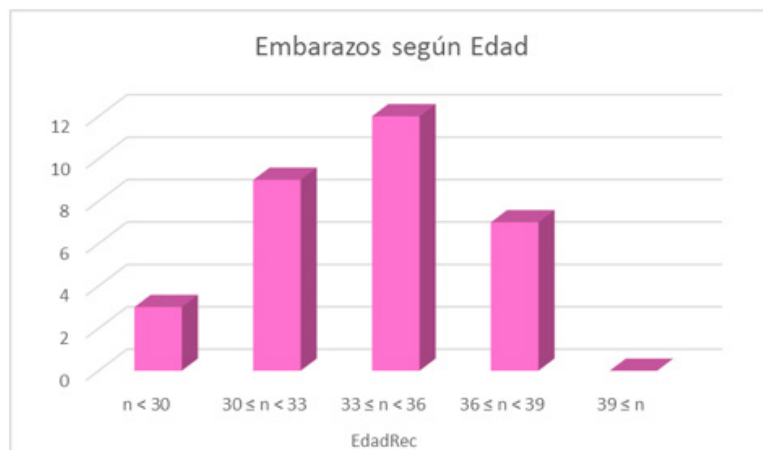


Tabla 3



	1	2	3	4	5	total
REM (x millones)	$n < 5$	$5 \leq n < 10$	$10 \leq n < 20$	$20 \leq n < 40$	$40 \geq n$	
Nº Ciclos	19	15	63	90	84	271
Nº Gestaciones	0	1	8	13	8	30
% <u>Gestac/ciclo</u>		6,66	12,69	14,44	9,52	

	1	2	3	4	5	Total
Edad (años)	$n < 30$	$30 \leq n < 33$	$33 \leq n < 36$	$36 \leq n < 39$	$n \geq 39$	
Nº de Ciclos	20	62	111	73	5	271
Nº Gestaciones	3	8	12	7	0	30
% <u>Gestac/ciclo</u>	15	12,90	10,81	9,58		

	1	2	3	4	5	total
FN (%)	$n < 4$	$4 \leq n < 7$	$7 \leq n < 10$	$10 \leq n < 14$	$n \geq 14$	
Nº de Ciclos	6	38	61	77	89	271
Nº Gestaciones <u>clínicas</u>	0	5	6	9	10	30
% <u>Gestac/ciclo</u>		13,15	9,83	11,68	11,23	

P-133 ¿PODEMOS REDUCIR EL TIEMPO DE INCUBACIÓN DE OVOCITOS Y ESPERMATOZOIDES EN FIV CONVENCIONAL?

N. Díaz Hernández, C. Olmedo Illueca, A. García Belda, I. Cuevas Saiz
Hospital General Universitario de Valencia, Valencia
icuevassaiz@yahoo.es

INTRODUCCIÓN:

Los protocolos habituales de FIV convencional (FIVc) suelen emplear tiempos de incubación prolongados entre el ovocito y los espermatozoides (16-20 horas). En 1996, Gianaroli describe la incubación corta de gametos (2-4 horas) buscando reducir la exposición de los ovocitos a los espermatozoides debido al exceso de radicales libres de oxígeno liberados por los mismos. Dicho estudio mostraba un aumento significativo de las tasas de fecundación así como de implantación.

Con respecto al tiempo de coincubación hay una gran controversia, siendo muchos los expertos que aseguran un incremento significativo de las tasas de fecundación, implantación y embarazo con la incubación corta, aunque existen trabajos que demuestran el beneficio de la incubación prolongada incrementando las tasas de implantación y embarazo.

OBJETIVOS:

El objetivo del siguiente estudio es comprobar si coincubar los ovocitos durante períodos cortos de tiempo resulta, al menos, igual de efectivo que la coincubación larga y, en ese caso, implantarlo como método de coincubación a la rutina del laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS:

En Enero de 2015 se realizó en el laboratorio la primera FIVc en un ciclo

mixto, asegurando fecundación con la microinyección y comprobando en la FIVc que el tiempo de coincubación descrito en la bibliografía era suficiente para producir fecundación. Tras observar adecuada fecundación, se comenzó a realizar en todos los ciclos de FIVc. No se llevó cabo ningún tipo de aleatorización, sino que fueron comparados 30 ciclos realizados con anterioridad a Enero de 2015 y 14 posteriores a esa fecha. Se analizaron de forma retrospectiva 181 ovocitos de 30 pacientes con coincubación larga de 16-18h (grupo 1), frente a 62 ovocitos de 14 pacientes con coincubación corta de 2-3h (grupo 2). La inseminación de los ovocitos se realizó 4-5 horas post-aspiración folicular en microgotas de 20µl de espermatozoides a una concentración de 1 millón/ml diluidos en medio de cultivo Fertilization (Cook® Medical) cubiertas de aceite mineral. Los ovocitos fueron decumulados tras el período de incubación correspondiente al grupo y se valoró la fecundación de todos los embriones a las 16-18h post-inseminación. Tras la decumulación, los ovocitos fueron cultivados en microgotas de 20 µl de medio Continuous Single Culture™ (Irvine) hasta su llegada a estadio de blastocisto. Se hizo un seguimiento de los embriones y se valoraron según criterios de clasificación ASEBIR.

Los datos fueron analizados mediante el programa SPSS v 15. Se realizaron estadísticos descriptivos de ambos grupos, pruebas de normalidad de las variables analizadas y se utilizó la

t-student para hacer la comparación de medias.

RESULTADOS:

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la causa de esterilidad, edad de la paciente (grupo 1= 34.0±3.4; grupo 2= 34.9±4.5), ni edad del varón (grupo 1= 35.9±4.2; grupo 2= 37.8±3.0). Tampoco se hallaron diferencias estadísticamente significativas en las siguientes variables (siendo p-valor < 0,05 en todos los casos): tasa de fecundación (grupo 1= 68.47%; grupo 2= 66.43%), número células en día 2 y 3 (grupo 1= 3.88 y 6.94; grupo 2= 4.18 y 7.51), calidad embrionaria en día 2 (p-valor 0.3) y día 3 (p-valor 0.8), tasa de formación de blastocisto (grupo 1= 49.56%; grupo 2=51.08%) y tasa de implantación (grupo 1= 38.89%; grupo 2= 37.50%).

CONCLUSIONES:

En nuestro laboratorio, la coincubación corta es igual de efectiva que la larga y, por lo tanto, quedará implantada para la realización de los ciclos de FIVc. Aunque todos los casos incluidos tenían confirmados los sacos gestacionales, realizaremos nuevos estudios para comparar las tasas de recién nacido con ambas técnicas.

P-134 OPTIMIZACIÓN DE CRIOTRANSFERENCIAS

L Gijón Tévar, J Oltra Chicote, X Moreno Mari, R Ferrer Loro, M Alfonso Balaguer, E Santaines Borreda, M Dolz Arroyo
FIV Valencia, Valencia
lgijon@fiv-valencia.es

INTRODUCCIÓN:

Debido a la cada vez mayor supervivencia y funcionalidad de los embriones crioconservados, los ciclos de desvitrificados aportan un número mayor de embriones viables y la posibilidad de trabajar con estos embriones es también mayor. Es posible cultivarlos, alcanzar el estadio de blastocisto con mayor seguridad y realizar transferencias de embrión único, incrementando las tasas de embarazo. Además el cultivo de embriones desvitrificados hasta el estadio de blastocisto permite optimizar la transferencia, valiéndonos de los mejores embriones.

Al mismo tiempo llevar a cabo ciclos de desvitrificados uno tras otro sin éxito, deja a los pacientes con la sensación de fracaso biológico, una pérdida de autoestima y genera un desgaste psicológico importante, además de repercutir negativamente en el plano económico.

OBJETIVOS:

Obtener un protocolo que permita optimizar los resultados en las transferencias de embriones crioconservados, incrementando la tasa de embarazo y reduciendo el agotamiento psicológico de las pacientes y el gasto económico.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo, observacional, de casos y controles, de 415 ciclos de desvitrificación de embriones, provenientes de pacientes estimuladas o del programa de ovorrecepción, entre los años 2013 y 2015. Se clasificaron los ciclos de desvitrificación de embriones en dos grupos, según si había cultivo (desde día +2/+3 hasta día +5/+6) o no de los mismos. Se observaron el porcentaje de transferencias, la tasa de formación de blastocisto en el grupo de cultivo y se recogieron los resultados de embarazo clínico. Los datos fueron recogidos mediante la base de datos del centro y analizados por medio del programa estadístico SPSS.

RESULTADOS:

No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos en función a edad u origen de los ovocitos, ni tampoco en el número de embriones transferido, si bien la media es inferior en el grupo con cultivo. Observamos que 1 de cada 3 ciclos pertenece al grupo con cultivo, aunque la tendencia del 2015 es a igualar los grupos al 50%.

Obtenemos una tasa de formación de blastocistos de casi el 40% y transferimos en el 90% de los ciclos (frente al 97% de transferencias en el grupo sin cultivo).

En cuanto a tasas de embarazo se refiere es donde encontramos las mayores diferencias, mientras que transfiriendo embriones en estadios de células alcanzamos un 30% de embarazos, en el grupo con cultivo la tasa alcanza el 45% de pacientes embarazadas.

CONCLUSIONES:

Se obtiene un beneficio claro del cultivo de embriones desvitrificados hasta blastocisto. Por una parte estamos seguros de cuáles son los embriones que se recuperan de la desvitrificación, no solo por el aspecto, sino también por su viabilidad. Por otra transferimos blastocistos, cuyo potencial implantatorio es superior. Y por último reducimos el número de ciclos de embriones desvitrificados, lo cual no desgasta tanto psicológicamente a las parejas y las beneficia económicamente.

Por todo ello el protocolo de acción en las transferencias de embriones vitrificados que realizamos está cambiando, en aquellos ciclos en los que se disponen de más embriones que los que se van a transferir recomendamos llevar a cabo el cultivo hasta el día +5/+6. Incluso, al hilo de esta decisión, en aquellos casos en que los embriones que hay son los que se van a transferir, los mantenemos en cultivo al menos durante 24 horas para estar seguros de la viabilidad de los embriones.

P-135 IDENTIFICACIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LA AMPK EN EL ESPERMATOZOIDE HUMANO

MJ. Bragado González (1), V. Calle Guisado (1), E. Matilla (2), N. Hernández (2), J. Mijares (2), A. Hurtado de Llera (1), D. Martín Hidalgo (1), IS. Álvarez (1)

(1) Universidad de Extremadura, Cáceres, (2) Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, Cáceres
jbragado@unex.es

INTRODUCCIÓN:

La proteína quinasa activada por AMP, AMPK, es una Ser/Thr quinasa muy conservada desde el punto de vista evolutivo, que actúa como una molécula sensora de la carga energética celular, y cuya activación provoca una regulación del metabolismo celular en respuesta a la carga energética, determinada por la relación entre la concentración de AMP y ATP. Una de las características esenciales de la AMPK es su sensibilidad a su efector alostérico AMP, ya que cualquier aumento en el ratio AMP/ATP provoca la activación de la AMPK. De forma adicional, la fosforilación en el residuo de Thr172 localizado en la subunidad catalítica de la AMPK, es necesaria para lograr la actividad enzimática máxima de la AMPK.

El espermatozoide es una célula germinal altamente especializada para poder desempeñar procesos funcionales característicos como son la movilidad, hiperactivación, capacitación o la reacción acrosómica, que posibilitan su función primordial: la fecundación del óvulo. Todos estos procesos funcionales son por un lado dependientes del estado energético de la célula y por otro están regulados por mecanismos bioquímicos dependientes de la fosforilación de proteínas. Previamente, nuestro grupo ha demostrado por primera vez la presencia, localización y función de esta quinasa en el espermatozoide de mamíferos (cerdo).

Hasta la fecha no se ha investigado la expresión de la AMPK en el espermatozoide humano.

OBJETIVOS:

El objetivo de este trabajo es estudiar la presencia y localización celular de la quinasa AMPK y de su forma activa (fosforilada en Thr-172) en el espermatozoide humano.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se ha utilizado la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Muestras de semen procedentes de 6 donantes fueron procesadas y diluidas a una concentración de 20 millones/ml. Se fijaron alícuotas de 40 µl con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos. Las muestras fueron permeabilizadas mediante incubación con PBS, pH 7.4 y 0.25% TritonX-100 durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se bloquearon las posibles uniones inespecíficas del anticuerpo mediante incubación con PBS 0.1% TWEEN-20 y 1% BSA durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se incubaron las muestras con dos anticuerpos primarios: a) anti-AMPK (1:50) durante toda la noche a 4°C o b) anti-fosfo-Thr172-AMPK durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación se incubaron con Alexa Fluor 488 goat anti-rabbitIgG (1:200) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Finalmente los cubres fueron

incubados con una solución comercial de DAPI 125 ng/ml para la tinción de los núcleos de los espermatozoides. Se almacenaron en oscuridad a 4°C y las imágenes de fluorescencia fueron obtenidas con un microscopio de fluorescencia confocal (FluoviewFV1000 Olympus, Tokio) y procesadas con el programaFluoviewviewer (FV10-ASW 4.1 Viewer).

RESULTADOS:

Los resultados revelan que la proteína AMPK se encuentra presente en todas las regiones del espermatozoide humano. En concreto está localizada en el acrosoma, la pieza intermedia y a lo largo del flagelo. Por otro lado, la forma enzimáticamente activa (fosfo-Thr172-AMPK), se localiza también en todo el espermatozoide, aunque se detectan dos zonas con menor intensidad de señal de inmunofluorescencia: la región post-acrosomal de la cabeza y la región intermedia de la cola.

CONCLUSIONES:

La proteína reguladora del metabolismo energético celular, AMPK, se ha identificado por primera vez en el espermatozoide humano. Se ha localizado su presencia en las diferentes partes del espermatozoide humano, teniendo su forma activa, fosfo-Thr172-AMPK, una mayor presencia en la región más apical del acrosoma y en la zona principal y terminal del flagelo.

P-136 EFECTOS DEL TIEMPO Y SISTEMA DE ALMACENAJE EN LA SUPERVIVENCIA Y FECUNDACIÓN DE OVOCITOS DE RATÓN VITRIFICADOS

E. Matilla Pinto, N. Hernández Rollán, C. Tobajas Vega, FM. Sánchez Margallo, J. Mijares Gordún
 Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, Cáceres
nhernandez@ccmijesususon.com

INTRODUCCIÓN:

La criopreservación de ovocitos ha adquirido un papel cada vez mayor en las técnicas de reproducción asistida. El procedimiento puede ofrecer soluciones a una serie de problemas clínicos, logísticos y sociales (Nagy et al., 2009). El ovocito en metafase II parece ser susceptible a daños por congelación-descongelación (Fabbri et al, 2001), y se ha sugerido que tanto el tiempo que los ovocitos permanecen vitrificados como el soporte de criopreservación podrían influir en el éxito de la técnica. Existen sistemas de almacenaje "cerrados" donde la pajueta está sellada herméticamente e impide que el ovocito entre en contacto directo con el nitrógeno líquido y sistemas "abiertos", que pone los gametos en contacto con nitrógeno líquido durante la criopreservación.

OBJETIVOS:

La finalidad de este estudio ha sido comprobar la supervivencia y la tasa de desarrollo hasta blastocisto en modelo murino de ovocitos vitrificados en distintos sistemas, abierto y cerrado, y en relación al tiempo de criopreservación.

MATERIAL Y MÉTODOS:

A las ratonas de entre 8 y 12 semanas de edad se les administró una dosis de 8 UI de gonadotropinas coriónica equina intraperitoneal (eCG) para desencadenar la foliculogénesis. 49 horas después se administraron 10 UI

de gonadotropina coriónica humana (hCG) intraperitoneal para provocar la ovulación. La denudación de los complejos cúmulo-ovocito se llevó a cabo mediante una solución de 80UI/ml de hialuronidasa. Los ovocitos en metafase II fueron vitrificados en dos tipos de soporte: sistema abierto y cerrado. Se mantuvieron en nitrógeno líquido durante 90-100 días (Grupo 1) y 150-160 días (Grupo 2). Después de la descongelación se valoró el número de ovocitos supervivientes los cuales, fueron usados para la fecundación in vitro y su posterior cultivo hasta blastocisto según el protocolo utilizado en nuestro laboratorio. Se realizó un recuento del número de blastocistos desarrollados en el grupo control formado por ovocitos frescos, no sometidos a la vitrificación y los grupos experimentales.

RESULTADOS:

La tasa de supervivencia tras la vitrificación durante 90-100 días en sistema abierto (95,31±10,07) es ligeramente superior al sistema cerrado (92,22±12,00) aunque las diferencias no son significativas ($p>0,05$). Así mismo, la tasa de desarrollo hasta blastocistos para el mismo tiempo de almacenaje también se mostró superior en sistema abierto (91,25±16,85) que en sistema cerrado (79,86±22,36) no encontrándose tampoco diferencias significativas ($p>0,05$) entre grupos.

Para los tiempos 150-160 días observamos mejores resultados en

sistema cerrado en cuanto a las tasas de supervivencia y desarrollo hasta blastocisto (91,42±15,11 y 84,40±19,07 respectivamente) frente al sistema abierto (87,05±22,64 y 74,11±25,20) aunque estas diferencias no fueron significativas ($p>0,05$). En cuanto a la comparativa intergrupala (grupo1, 2 y control) tampoco se evidencian diferencias significativas en desarrollo hasta estadio de blastocisto.

Todos los resultados se analizaron mediante el programa de análisis estadístico SPSS.

CONCLUSIONES:

Nuestros resultados sugieren que un aumento del tiempo de almacenaje no disminuye la tasa de supervivencia, fecundación y desarrollo a blastocisto. Comparando ambos parámetros en los distintos soportes no advertimos diferencias significativas en ovocitos vitrificados respecto a los distintos valores de tiempo en modelo murino.

BIBLIOGRAFÍA:

Nagy ZP, Chang CC, Shapiro DB, Bernal DP, Kort HI, Vajta G. The efficacy and safety of human oocyte vitrification. *Semin Reprod Med* 2009b;27:450-455.

Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S and Flamigni C. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Human Reproduction*. 2001; 16: 411-416.

P-137 DIFERENCIAS EN LA SEX RATIO EN TRANSFERENCIAS D3 VERSUS BLASTOCISTO DE OVODONACIÓN TRAS CULTIVO EN TIME LAPSE

M. Leanizbarrutia Santamaría, G. Parra De Francisco, F. Ayerdi Irizar, M. Ferrando Serrano, Z. Larreategui Laiseca
IVI BILBAO, Bilbao, Vizcaya
mleanizbarrutia@ivi.es

INTRODUCCIÓN:

Tras valorar un mayor número de RNV niños en transferencias realizadas en D5 que niñas y la no diferencia entre sexos en transferencias de D3, se quiso profundizar con ayuda de la tecnología Time Lapse en los motivos por los que la selección embrionaria se veía favorecida hacia un sexo u otro o no, en función del momento evolutivo.

OBJETIVOS:

El objetivo principal del estudio es comprobar si los distintos perfiles embriocinéticos pueden agruparse en función del sexo y el momento de selección para la transferencia.

MATERIAL Y MÉTODOS:

La presente línea de investigación es un estudio retrospectivo unicéntrico que pretende analizar la Sex Ratio de transferencias embrionarias realizadas en los diferentes estadios embrionarios de D3 y D5 procedentes de tratamientos de ovodonación en IVI Bilbao.

La reciente incorporación de incubadores con tecnología Time Lapse al cultivo embrionario ha dado lugar al descubrimiento de perfiles predictivos de gestación e implantación basándose en tiempos de divisiones celulares. Convirtiendo la embriocinética en una nueva herramienta de selección embrionaria aumentando así las tasas de gestación de los tratamientos de RA. Por ello se ha analizado ciclos de ovodonación en los que los embriones fueron cultivados en el Embryoscope para poder comparar la morfocinética en ambos sexos y ambos momentos de selección embrionaria (D3 versus D5).

RESULTADOS:

Se observan diferencias significativas en transferencias de D5 entre RNV niños y niñas (63.16 % versus 36,85%) mientras que en transferencias de D3 no se observaron entre niños y niñas (52.5% versus 47.5%).

Al analizar la morfocinética embrionaria no se observan diferencias significativas entre ambos sexos en el mismo estadio de selección de la transferencia en D5 niños versus niñas (t2: 27.33 versus 25.60; t3: 38.63 versus 37.33%; t4: 40.36 versus 50.79; t5: 52.30 versus 52.59; t6:54.19 versus 54.20; t7:56.57 versus 57.35). Al analizar los resultados en D3 (t2: 26.11 versus 27.70; t3: 37.90 versus 38.13%; t4: 39.23 versus 40.82; t5: 53.36 versus 50.78; t6:55.03 versus 55.00; t7:56.38 versus 57.16).

CONCLUSIONES:

El análisis de los datos señaló que no existen diferencias significativas en transferencias realizadas en D3 de desarrollo entre ambos sexos ni entre tiempos de división celulares de ambos grupos, mientras que en D5 apunta una diferencia entre el número de RNV niños que implantaron en transferencias procedentes de una selección en D5.

BIBLIOGRAFÍA:

1. The use of morphokinetics as a predictor of implantation: a multicentric study to define and validate an algorithm for embryo selection. Basile N, Vime P, Florensa M, Aparicio Ruiz B, García Velasco JA, Remohí J, Meseguer M. Hum Reprod. 2015 Feb; 30(2):276-83. doi: 10.1093/humrep/deu331. Epub 2014 Dec 19.

2. No evidence of association between blastocyst aneuploidy and morphokinetic assessment in a selected population of poor-prognosis patients: a longitudinal cohort study. Rienzi L, Capalbo A, Stoppa M, Romano S, Maggiulli R, Albricci L, Scarica C, Farcomeni A, Vajta G, Ubaldi FM. Reprod Biomed Online. 2015 Jan; 30(1):57-66. doi: 10.1016/j.rbmo.2014.09.012. Epub 2014 Oct 5.

3. What does morphokinetics add to embryo selection and in-vitro fertilization outcomes? Basile N, Caiazza M, Meseguer M. Curr Opin Obstet Gynecol. 2015 Jun;27(3):193-200. doi: 10.1097/GCO.0000000000000166.

4. Morphokinetic analysis of cleavage stage embryos and its relationship to aneuploidy in a retrospective time-lapse imaging study. Chawla M, Fakh M, Shunnar A, Bayram A, Hellani A, Perumal V, Divakaran J, Budak E. J Assist Reprod Genet. 2015 Jan; 32(1):69-75. doi: 10.1007/s10815-014-0372-3. Epub 2014 Nov 14.

5. Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope. Rubio I, Galán A, Larreategui Z, Ayerdi F, Bellver J, Herrero J, Meseguer M. FertilSteril. 2014 Nov; 102(5):1287-1294. e5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.07.738. Epub 2014 Sep 11.

6. Assessing morphokinetic parameters via timelapse microscopy (TLM) to predict euploidy: are aneuploidy risk classification models universal? Kramer YG, Kofinas JD, Melzer K, Noyes N, McCaffrey C, Buldo-Licciardi J, McCulloh DH, Grifo JA. J Assist Reprod Genet. 2014 Sep; 31(9):1231-42. doi: 10.1007/s10815-014-0285-1. Epub 2014 Jun 25.

7. Comparison of gender-specific human embryo development characteristics by time-lapse technology. Serdarogullari M, Findikli N, Goktas C, Sahin O, Ulug U, Yagmur E, Bahceci M. *Reprod Biomed Online*. 2014 Aug; 29(2):193-9. doi: 10.1016/j.rbmo.2014.03.026. Epub 2014 May 15.
8. Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis. Basile N, Nogales Mdel C, Bronet F, Florensa M, Riqueiros M, Rodrigo L, García-Velasco J, Meseguer M. *Fertil Steril*. 2014 Mar; 101(3):699-704. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.12.005. Epub 2014 Jan 11.
9. Prevalence, consequence, and significance of reverse cleavage by human embryos viewed with the use of the Embryoscope time-lapse video system. Liu Y, Chapple V, Roberts P, Matson P. *Fertil Steril*. 2014 Nov; 102(5):1295-1300.e2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.07.1235. Epub 2014 Sep 12.
10. Oocyte insemination techniques are related to alterations of embryo developmental timing in an oocyte donation model. Cruz M, Garrido N, Gadea B, Muñoz M, Pérez-Cano I, Meseguer M. *Reprod Biomed Online*. 2013 Oct;27(4):367-75. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.06.017. Epub 2013 Jul 12.
11. Selection of high potential embryos using time-lapse imaging: the era of morphokinetics. Herrero J, Meseguer M. *Fertil Steril*. 2013 Mar 15; 99(4):1030-4. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.01.089. Epub 2013 Feb 6. Review.

P-138 RESULTADOS PRELIMINARES EN UN PROGRAMA DE CRIOTRANSFERENCIA EN BLASTOCISTO POR IMPOSIBILIDAD DE TRANSFERENCIA EN FRESCO

P. Duque Álvarez, B. de la Torriente Benito
Clínica Mencía, Salamanca
embriologia@clinicamencia.es

INTRODUCCIÓN:

Es sabido que existen pacientes en las que no es posible realizar la transferencia embrionaria en el mismo ciclo de estimulación, bien por riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO), por elevados niveles de progesterona sérica (PG) al final de la estimulación o por otros motivos como la posibilidad de que esté indicado hacer un legrado uterino antes de la transferencia.

Los buenos resultados obtenidos en la actualidad con embriones criopreservados debido a la puesta a punto de las técnicas vitrificación y desvitrificación han permitido obtener tasas de éxito similares a las obtenidas con embriones en fresco.

Por otro lado, en los últimos años, la aparición de la tecnología time-lapse que permite el cultivo de embriones en un ambiente estable junto con el uso de bajas concentraciones de oxígeno han hecho posible la obtención blastocistos de buena calidad y en elevado porcentaje.

OBJETIVOS:

El objetivo de este estudio ha sido revisar nuestros resultados en un programa de criotransferencia en estadio de blastocisto en aquellos ciclos de microinyección espermática (ICSI) en los que resulta imposible transferir embriones en fresco.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se llevaron a cabo un total de 17 ciclos de ICSI entre enero de 2014 y abril de 2015. La media de edad fue de 37.7 años. En ninguno de estos ciclos se pudo realizar la transferencia embrionaria por diversos motivos (riesgo de SHO, elevados niveles de PG al final del ciclo de estimulación, necesidad de realizar legrado uterino...).

Los embriones obtenidos en los ciclos de ICSI se cultivaron en incubador con tecnología time-lapse y baja concentración de oxígeno, hasta el día 5-6 de desarrollo, momento en que fueron vitrificados aquellos que alcanzaron el estadio de blastocisto. La criotransferencia se llevó a cabo en un

ciclo posterior en cuanto fue posible por indicación ginecológica.

RESULTADOS:

Se obtuvo una tasa de fertilización de 65.31% y una tasa de blastocistos respecto a los embriones obtenidos de 52.08%. Tras la desvitrificación, la tasa de supervivencia fue de un 90,48%. La media de blastocistos transferidos fue de 2.24.

La tasa de gestación por transferencia se situó en un 41.18% y la tasa de implantación fue de 31.58%.

CONCLUSIONES:

Con estos resultados, aun siendo bajo el número de casos, podemos decir que, con la tecnología y los conocimientos actuales, se puede ofrecer una tasa muy aceptable de éxito en ciclos con blastocistos vitrificados (teniendo en cuenta la media de edad); en aquellas pacientes de ICSI en las que, por diversos motivos, no es posible realizar la transferencia en el mismo ciclo de la estimulación.

P-139 EMBARAZO EVOLUTIVO DE UN EMBRIÓN PROVENIENTE DE UN OVOCITO MADURADO IN VITRO: ANÁLISIS DE CASO CLÍNICO.

P. Piqueras Trilles (1), M. Gallardo Molina (1), M. Hebles Duvisón (1), F. Sánchez Martín (2)
(1) Ginemed Sevilla, Sevilla. (2) Ginemed Sevilla; Unidad de Reproducción Malo Clinic Medical Care. Lisboa
PPiqueras@ginemed.es

INTRODUCCIÓN:

En tratamientos de fecundación in vitro con estimulación ovárica podemos obtener una cohorte ovocitaria muy heterogénea, es decir tanto ovocitos en metafase II (MII), metafase I (MI) como vesículas germinales (VG). Entre el 5 y 20% de los ovocitos obtenidos en un ciclo con estimulación ovárica son inmaduros. Sin embargo pueden madurarse de forma espontánea cuando se libera del ambiente folicular. Dichos ovocitos inmaduros pueden madurar en el 30-50% de los casos en ciclos sin estimulación ovárica y en el 60-80% de los casos en ciclos con estimulación ovárica.

Los ovocitos en MI o VG son descartados según los protocolos de fecundación in vitro. Sin embargo, si los dejamos madurar en condiciones in vitro pueden alcanzar el estadio de MII y en caso de ser fecundados dar lugar a embriones que pueden producir un embarazo.

OBJETIVOS:

Presentar un caso clínico en el que se obtuvo un embarazo con un embrión proveniente de un óvulo en MI.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Mujer de 35 años en un ciclo de estimulación ovárica de IVF. El protocolo de estimulación establecido fue corto con antagonistas de la GnRH. Se inició el día uno de ciclo una dosis de 150 (3UI) de FSH y LH (Menopur) combinándolo con 150 (3UI) de FSH (Gonal). En día siete de ciclo se suministra un antagonista (Orgalutrán) para inducir la frenación y en día nueve de ciclo se desencadena la ovulación con HCG (Ovitrelle).

Los folículos mayores de 16mm vistos en ecografía transvaginal tres días antes de la punción ovocitaria fueron cuatro, uno de 18mm en el ovario derecho y tres de 17 y 20mm en el ovario izquierdo. A las 36 horas de la HCG se realiza la punción ovárica. En el pick up conseguimos dos ovocitos, de los cuales solo uno era MII. El otro ovocito captado era MI. Dejamos en cultivo el MI en medio de cultivo IVF (Vitrolife) durante 25-30 horas post denudación. Tras ese periodo de tiempo el ovocito ha extruido el corpúsculo polar y por tanto ha madurado. Lo microinyectamos y dejamos en cultivo. A las 19 horas de la microinyección observamos que el ovocito está fecundado. Seguimos su desarrollo y en día dos post- microinyección tenemos un embrión normal de cuatro células, una fragmentación de entre 11-25% y blastómeras asimétricas. El embrión es transferido en día dos post- microinyección.

RESULTADOS:

Doce días tras la transferencia embrionaria se hace una analítica de la B-HCG en sangre, el resultado es positivo, pero no confirmamos el embarazo hasta que no se hace una ecografía al mes de la transferencia embrionaria. Finalmente se observa la presencia de un saco embrionario. Actualmente el embarazo sigue su curso con normalidad.

CONCLUSIONES:

Los óvulos inmaduros recuperados en punción pueden madurar in vitro y ser fecundados, obteniendo embriones que pueden dar lugar a embarazo. Como alternativa a descartarlos directamente, se recomienda dejar en cultivo dichos ovocitos hasta pasadas entre 25-30 horas, en caso de que presenten signos

morfológicos de haber alcanzado la madurez, la extrusión del corpúsculo polar, pueden ser microinyectados. Esto es especialmente útil en pacientes de baja respuesta que disponen de una cohorte de ovocitos muy limitado; de esto modo maximizamos sus posibilidades de embarazo.

BIBLIOGRAFÍA:

- Akman MA, Erden HF, Tosun SB, Bayazit N, Aksoy E, Bahceci M, Comparison of agonistic flare-up-protocol and antagonistic multiple dose protocol in ovarian stimulation of poor responders: results of a prospective randomized trial, *Hum Reprod* 16:868,2001.
- De Vos A, Van de Velde H, Joris H, Van Steirteghem A. In-vitro matured metaphase-I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as mature metaphase-II oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999;14:1859-63.
- Edwards RG. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 1965;208:349-51.
- Esrich L, Grau N, Mercader A, Rubio C, Pellicer A, Escriba MJ. Spontaneous in vitro maturation and artificial activation of human germinal vesicle oocytes recovered from stimulated cycles. *J Assist Reprod Genet* 2011;28(2):111-7.
- Kim BK, Lee SC, Kim KJ, Han CH, Kim JH. In vitro maturation, fertilization, and development of human germinal vesicle oocytes collected from stimulated cycles. *Fertil Steril* 2000;74(6): 1153-8.

P-140 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA PUBLICACIÓN DE LA GUÍA DE REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA DEL SERVICIO ANDALUZ DE SALUD EN LA IMPLANTACIÓN DE ESET EN UN CENTRO PÚBLICO.

A. Clavero Gilabert, MC. Gonzalvo López, S. Ruiz Durán, P. Navas Bastida, I. Sánchez Castelló, A. Guzmán Olmedo, L. Martínez Granados, ML. López Regalado, V. Díaz Prado, M. Luengo Díaz, JA. Castilla Alcalá
U. Reproducción. Complejo Hospitalario Granada. IBS Granada. Granada
anaclaveroGilabert@gmail.com

INTRODUCCIÓN:

La implantación de la eSET es un proceso complicado, más aún en el sistema público, donde el número de ciclos de tratamiento ofrecidos a las parejas es limitado. Por ello, en algunos países noreuropeos se han seguido políticas de promoción de esta técnica. En España, Andalucía es la primera Comunidad donde se promueve de forma activa la eSET como prevención del embarazo múltiple.

OBJETIVOS:

Evaluar el impacto en las tasas de eSET en nuestro centro tras la introducción de la Guía de RA del Servicio Andaluz de Salud en diciembre de 2013.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se realizó un estudio observacional retrospectivo desde enero de 2005 hasta marzo de 2015 analizando la tasa de realización de eSET en nuestro centro en las transferencias en fresco de ovocitos propios (4275) y de donante (329). Se analizaron las tasas anuales, así como las mensuales desde enero de 2014. Se dividieron las transferencias en tres grupos: un basal de 2005 a 2009 (Grupo 1), un grupo durante el cual se llevaba a cabo un proyecto de investigación FIS sobre eSET (2010-2013) (Grupo 2) y otro en el que ya estaba publicada la Guía de RHA (2014-2015) (Grupo 3). Así mismo, se compararon las tasas del año 2012 con las del último registro publicado de la SEF (2012). Se utiliza el test de la t de Student para variables cuantitativas. Para determinar el tamaño del efecto se determinó la odds ratio.

RESULTADOS:

Entre 2005-2009 realizamos un promedio de 1.6% de eSET, aumentando esta cifra a un 9.7% entre 2010-2013 y a un 19.3% entre 2014-2015 en ovocitos propios. En ovocitos de donante también se observó esta tendencia (0.4%, 7.7% y 31.4%).

Al comparar las tasas de eSET en ovocitos propios del grupo 2 con el grupo basal se observa una tasa de eSET significativamente mayor (OR=5.37; 3.77-7.65). Del mismo modo, hubo significativamente más transferencias eSET en el periodo del grupo 3 que en el del grupo 1 (OR=13.22; 8.99-19.43). Al comparar los grupos 2 y 3, observamos una realización de eSET significativamente mayor en el periodo 3, tras la publicación de la Guía de RHA (OR=2.46; 1.85-3.28).

Al analizar los resultados de ovocitos de donante, nos encontramos con unos resultados similares, aumentando la tasa de utilización de eSET al estar realizando el proyecto de investigación, pero no significativamente (periodo 2, OR=7.1; 0.92-55.86). Sin embargo, con la publicación de la Guía de RHA (periodo 3) se observa un aumento significativo de la tasa de eSET (OR=44.20; 5.55-351.78).

Al comparar nuestros datos con los del registro de 2012, no encontramos diferencias significativas en tasa de eSET de nuestro centro (11.5% vs 11.9%) en ovocitos propios, ni en ovocitos de donante (11.1% vs 17.9%).

Analizamos las tasas mensuales desde

enero de 2014, observando una tasa de eSET menor en los dos primeros meses (promedio de 10.2%), mientras que a partir de marzo de 2014 la tasa se elevó significativamente manteniéndose alrededor del 23% (OR= 2.65; 1.17-5.96).

CONCLUSIONES:

En nuestro centro la realización de un proyecto de investigación FIS sobre eSET ha tenido un efecto positivo en la implantación de la misma, dado que durante la realización del proyecto se ofrecía un ciclo extra a las parejas participantes. Tras la finalización del proyecto, y gracias a la publicación en Andalucía de la nueva Guía de RHA en la que se promueve activamente la realización de eSET, su utilización en transferencias en fresco se ha visto significativamente aumentada de nuevo. Creemos necesaria la implantación de políticas sanitarias encaminadas a promover la prevención del embarazo múltiple como la realizada en Andalucía.

AÑO	Transferencias en fresco OVOCITOS PROPIOS			
	eSET		TOTALES	
	Nº Transferencias	Nº Gestaciones	Nº Transferencias	% eSET/Transferencias Totales
2005	0	0	393	0,0%
2006	0	0	367	0,0%
2007	3	0	478	0,6%
2008	29	11	515	5,6%
2009	9	1	474	1,9%
2010	16	5	469	3,4%
2011	30	10	445	6,7%
2012	39	9	338	11,5%
2013	57	21	334	17,1%
2014	68	18	345	19,7%
2015	22	8	117	18,8%
TOTAL	273	83	4275	6,4%

AÑO	Transferencias en fresco OVOCITOS DE DONANTE			
	eSET		TOTALES	
	Nº Transferencias	Nº Gestaciones	Nº Transferencias	% eSET/Transferencias Totales
2005	0	0	0	0,0%
2006	0	0	4	0,0%
2007	0	0	24	0,0%
2008	0	0	26	0,0%
2009	1	0	49	2,0%
2010	2	1	50	4,0%
2011	0	0	56	0,0%
2012	5	0	45	11,1%
2013	5	2	32	15,6%
2014	10	2	34	29,4%
2015	3	1	9	33,3%
TOTAL	26	6	329	7,9%
TOTAL GLOBAL	299	89	4604	6,5%

P-141 ¿EXISTE CORRELACIÓN ENTRE EL NIVEL DE APOPTOSIS Y LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN ESPERMATOZOIDES?

I. Vilella Amorós (1), L. García Valverde (1), MC. García Poyo (1), P. Martínez Ortiz (1), M. Fernández Berenguer (1), MJ. Gómez Torres (2), Y. Franco Iriarte (3), J. Aizpurua Sáenz (1)

(1) IVF Spain, Alicante, (2) Departamento de Biotecnología (Universidad de Alicante), Alicante, (3) IVF Donosti, San Sebastián
i.vilella@ivf-spain.com

INTRODUCCIÓN:

En la bibliografía existen algunos estudios sobre la Fragmentación del ADN espermático y la Apoptosis en los que no se establece con claridad cuál es la relación entre estos dos parámetros que miden distintos acontecimientos en el espermatozoide. La Apoptosis es el proceso ordenado de muerte

de una célula ante estímulos extra o intercelulares. Mientras que la Fragmentación del ADN se ha convertido en un biomarcador para la infertilidad masculina porque se ha demostrado que podría causar defectos en el desarrollo del embrión, riesgo de pérdida del embarazo temprano o problemas en el desarrollo fetal. Además, muchos centros para eliminar la población

espermática altamente fragmentada utilizan una selección espermática basada en la técnica MACS, pero ¿es esto sensato? Pues esta técnica se basa en capturar aquellos espermatozoides que externalizan la fosfatidilserina en su membrana, evento característico de la etapa temprana de la apoptosis y no de la fragmentación del ADN.

OBJETIVOS:

El objetivo principal es estudiar la correlación entre las etapas tempranas de apoptosis celular en muestras espermáticas con la Fragmentación del ADN en dichas muestras, utilizando la citometría de flujo como herramienta principal.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se recogieron un total de 60 muestras espermáticas de pacientes normozoospermicos después de 2 días de abstinencia sexual desde Febrero hasta Mayo de 2015 en el laboratorio de Andrología de IVF SPAIN. Todas las muestras se centrifugaron 8 minutos a 1900 rpm con medio de lavado.

Todas las muestras fueron analizadas en fresco y la Fragmentación se midió utilizando la técnica del SCSA (Sperm Chromatine Structure Assay) mediante citometría de flujo.

La medición de la Apoptosis se basa en la molécula Fosfatidilserina. Las

células se marcan previamente con Anexina V, un anticuerpo específico de la Fosfatidilserina, de manera que la presencia de Fosfatidilserina es medida por citometría de flujo, utilizando la técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

RESULTADOS:

Para cada muestra, se calculó el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado y el porcentaje de espermatozoides apoptóticos vivos presentes en el total de la muestra. Tras ello, se procedió al análisis de la existencia o ausencia de relación entre ambos porcentajes. Se procede inicialmente a la realización del gráfico de dispersión de los pares de porcentajes. Los puntos de dicho gráfico muestran un comportamiento aleatorio bastante alejado de cualquier tipo de relación funcional. Para fundar estas observaciones se procede a su ajuste por regresión a distintas funciones (lineal, cuadrática, cúbica, logarítmica, potencial, exponencial, logística e inversa). Ninguno de los modelos

resulta significativo, proyectando un coeficiente de determinación menor que 0.005 en cada caso.

CONCLUSIONES:

Los resultados muestran que no hay correlación entre las etapas tempranas de la apoptosis y la fragmentación del ADN espermático. Determinar qué técnica es la más adecuada es complejo, al no guardar correlación no debemos excluir ninguna a la hora de evaluar el factor masculino. En cuanto al uso de la técnica MACS hay que tener mucha cautela, pues es muy útil para reducir los espermatozoides apoptóticos en la muestra final que se va a utilizar en las TRA pero no nos va a eliminar las células espermáticas con un alto % de fragmentación en su ADN ya que como explicamos su mecanismo de acción es otro. Somos conscientes de que se necesitan estudios a gran escala en diferentes situaciones clínicas para determinar el daño de la apoptosis y la fragmentación espermática en los resultados de TRA y su posible correlación.

Tabulación cruzada

		FRAGMENTACION		Total
		NO PATOLOGICA	PATOLOGICA >15%	
APOPTOSIS	NO PATOLOGICA	16	22	38
	PATOLOGICA >30%	11	11	22
Total		27	33	60

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)	Significación exacta (2 caras)	Significación exacta (1 cara)
Chi-cuadrado de Pearson	,351 ^a	1	,554		
Corrección de continuidad ^b	,104	1	,747		
Razón de verosimilitud	,350	1	,554		
Prueba exacta de Fisher				,599	,373
N de casos válidos	60				

a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 9,90.

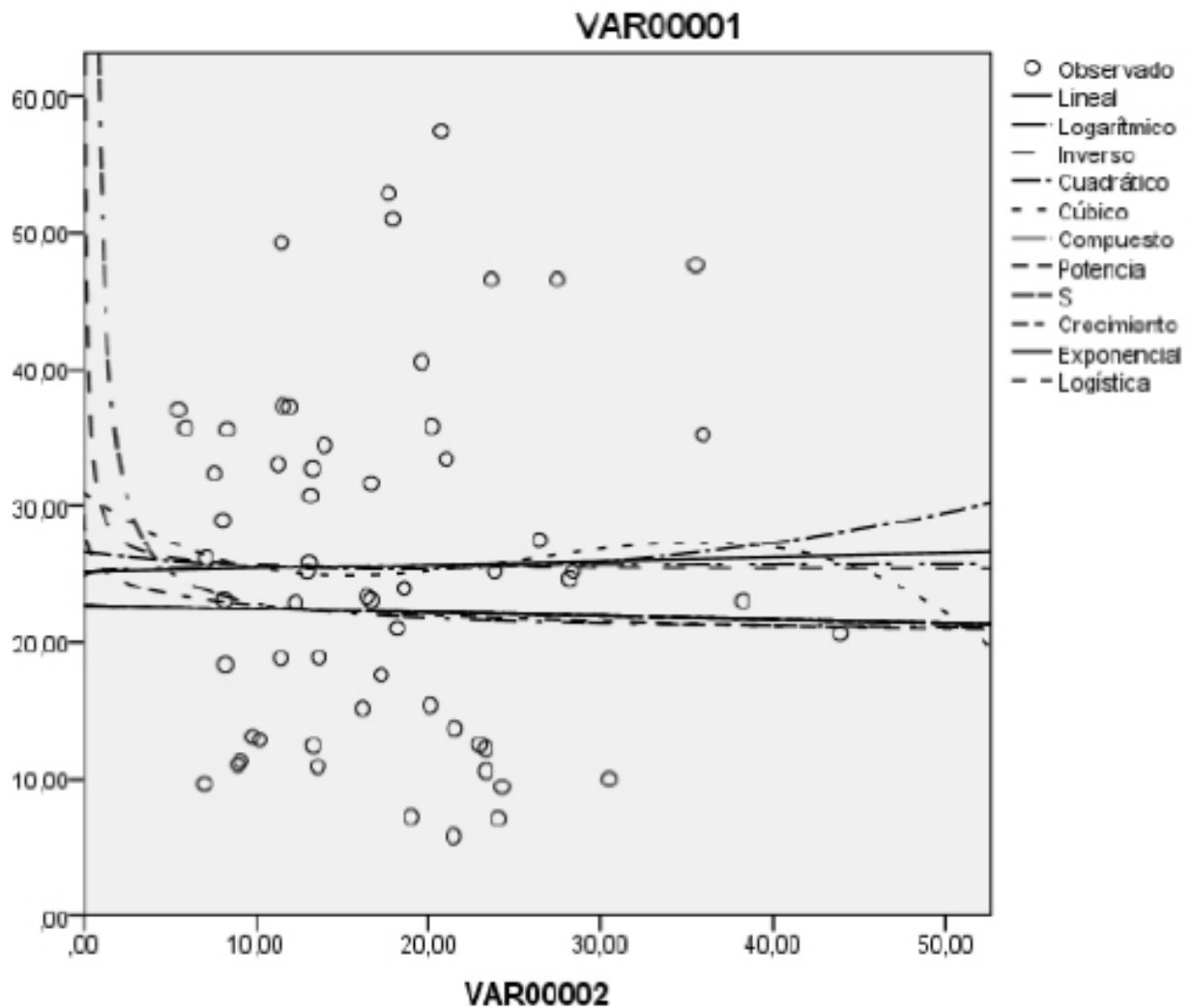
b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

Resumen de modelo y estimaciones de parámetro

Variable dependiente: VAR00001

Ecuación	Resumen del modelo					Estimaciones de parámetro			
	R cuadrado	F	df1	df2	Sig.	Constante	b1	b2	b3
Lineal	,000	,020	1	58	,889	25,139	,028		
Logarítmico	,000	,002	1	58	,965	25,218	,151		
Inverso	,000	,010	1	58	,920	25,300	4,691		
Cuadrático	,001	,035	2	57	,966	26,630	-,143	,004	
Cúbico	,003	,055	3	56	,983	31,042	-,936	,044	-,001
Compuesto	,000	,018	1	58	,894	22,704	,999		
Potencia	,002	,106	1	58	,746	25,463	-,049		
S	,004	,231	1	58	,632	3,033	,969		
Crecimiento	,000	,018	1	58	,894	3,123	-,001		
Exponencial	,000	,018	1	58	,894	22,704	-,001		
Logística	,000	,018	1	58	,894	,044	1,001		

La variable independiente es VAR00002.



PRINCIPAL PATROCINADOR



OTROS PATROCINADORES



CON LA COLABORACIÓN DE:



REVISTA DE EMBRIOLOGÍA CLÍNICA Y BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

www.asebir.com

ASEBIR

UNA APUESTA POR LA CALIDAD