



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Obstetricia y Ginecología

INFLUENCIA DEL FACTOR FEMENINO Y MASCULINO EN EL CULTIVO A BLASTOCISTO Y SUS IMPLICACIONES CLÍNICAS

*Memoria para optar al grado de Doctor
presentada por*

TERESA SÁNCHEZ ARENAS

Madrid, 2017



INFLUENCIA DEL FACTOR FEMENINO Y MASCULINO EN EL CULTIVO A BLASTOCISTO Y SUS IMPLICACIONES CLÍNICAS

Tesis Doctoral presentada por la licenciada

Teresa Sánchez Arenas

Para optar al grado de **DOCTOR**

Directores:

Dra. Cristina Urda Muñoz

Embrióloga del Laboratorio Fecundación *In Vitro*, GINEFIV, S.L.

Dr. Vicente Badajoz Liébana

Coordinador del Laboratorio Fecundación *In Vitro*, GINEFIV, S.L.

PROF. Dr. José Manuel Bajo Arenas

Catedrático de Ginecología y Obstetricia,

Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, 2017



Cristina Urda Muñoz, Licenciada en Biología, Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid, y embrióloga de Ginefiv, **Vicente Badajoz Liébana**, Licenciado en Biología, Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid, y Coordinador del Laboratorio de Fecundación *In Vitro* de Ginefiv y, el **Prof. D. José Manuel Bajo Arenas**, Catedrático de Ginecología y Obstetricia de la Universidad Autónoma de Madrid.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “INFLUENCIA DEL FACTOR FEMENINO Y MASCULINO EN EL CULTIVO A BLASTOCISTO Y SUS IMPLICACIONES CLÍNICAS” ha sido realizado por Dña. Teresa Sánchez Arenas bajo su dirección y se encuentra en condiciones de ser leído y defendido como Tesis para alcanzar el grado de Doctor ante el Tribunal correspondiente en la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, 23 de Mayo de 2017

Dra. Cristina Urda Muñoz

Dr. Vicente Badajoz Liébana

Prof. D. José Manuel Bajo Arenas

A mis **padres**, por enseñarme a ser constante.
A **Guillermo**, por descubrirme nuevos horizontes.
A **Carlos**, por ser mi pilar.

AGRADECIMIENTOS

Llegados a este punto, esta tesis doctoral no hubiera sido posible sin la ayuda de:

El **Dr. JOSÉ MANUEL BAJO ARENAS**, por darme la oportunidad de aprender y formarme como profesional en Ginefiv. Gracias por tus consejos, por estar siempre disponible cuando lo he necesitado y por la dedicación y ánimos que siempre nos das.

El **Dr. VICENTE BADAJOZ LIÉBANA**, por poner día tras día todos tus esfuerzos en liderar el gran equipo de profesionales que has sido capaz de formar. Equipo que gracias a tu constancia, preocupación y motivación es capaz de funcionar todos a una. Gracias por confiar y creer en mí. De mi compañera la **Dra. Cristina Muñoz Urda**, por ayudarme siempre que lo he necesitado y dedicarme tu tiempo. A **Dr. José Antonio Gragera Segura**, por tus enseñanzas y por tu ayuda con la base de datos. A **Moisés de la Casa Heras**, por formarme, por escucharnos siempre y poner todo de tu parte para que todo vaya bien. A **Lydia Martínez de la Cruz**, por ser más que una compañera. A **César Pérez Ortiz**, por ser como eres y transmitirnos tu fuerza día tras día. Gracias a los tres por haber podido contar con vosotros siempre que lo he necesitado.

De **TODOS** mis compañeros del **Laboratorio de FIV y Andrología**. Gracias por haberme enseñado tantas cosas y ¡tan bien enseñadas!, por ser una gran familia y por brindarme siempre vuestra ayuda. A **TODO** el equipo **Ginefiv**, por el amor con el que hacen su trabajo cada día. Siempre dispuestos a escucharte y ayudarte en todo lo que puedan.

De mis **TODOS** amigos, por todos los momentos que gracias a vosotros he tenido la suerte de vivir, gracias por todo lo que cada uno de vosotros aporta a mi vida. A María Valero Muñoz y Diego Garzón, porque por muy lejos que estéis, siempre podré contar con vosotros. María, gracias por ser mi confidente y amiga, por tus innumerables consejos, apoyo, ánimos, risas, viajes y un largo etcétera de momentos irrepetibles. Porque siempre serás mi BFF. A mi amigo Kike, porque eres un ejemplo de superación y aportas a mi vida más de lo que crees.

De toda mi **FAMILIA**: abuelos, tíos y primos. Porque he tenido la suerte de teneros siempre a mi lado. Gracias por poder contar con vosotros. A mis suegros, cuñados y sobrinos, por ser mi segunda familia y por haberme acogido con tanto cariño.

De mi hermano **GUILLERMO**, por enseñarme a ver la vida desde un punto de vista mucho más divertido, gracias por ser tan cariñoso y por estar ahí siempre que te he necesitado. A mis **PADRES**, por inculcarme sus valores, por enseñarme a ser luchadora y valorar que todo esfuerzo merece la pena. Gracias por darme todo vuestro apoyo siempre que lo he necesitado.

De **CARLOS**, porque sin ti esto no hubiera sido posible. Gracias por hacerme feliz cada día, por tu constante apoyo, por aguantarme estoicamente estos meses y por quererme tal y como soy. “Porque el amor es la fuerza más poderosa que existe, porque no tiene límites”. A Miky y a Luna.

ÍNDICE

ÍNDICE	11
RESUMEN	15
INTRODUCCIÓN	25
HIPÓTESIS	41
1.1. OBJETIVOS	41
MATERIAL Y MÉTODOS	45
1.1. EQUIPOS Y MATERIALES UTILIZADOS	45
EQUIPOS UTILIZADOS EN LA CONSULTA DE GINECOLOGÍA	45
EQUIPOS UTILIZADOS EN LA ZONA DE QUIRÓFANO	45
EQUIPOS UTILIZADOS EN EL LABORATORIO DE FIV	46
EQUIPOS UTILIZADOS EN EL LABORATORIO DE ANDROLOGÍA	46
1.2. SELECCIÓN DE PACIENTES	47
PACIENTES CON OVOCITOS PROPIOS.....	48
PACIENTES CON RECEPCIÓN DE OVOCITOS	54
PACIENTES CON SEMEN HOMÓLOGO	56
PACIENTES CON SEMEN DE DONANTE.....	65
1.3. OBTENCIÓN DE EMBRIONES	66
PUNCIÓN OVÁRICA.....	67
DECUMULACIÓN DE LOS CCOO	68
SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES Y MICROINYECCIÓN ESPERMÁTICA	69
DESARROLLO EMBRIONARIO	71
TRANSFERENCIA DE BLASTOCISTOS	81
CRIOPRESERVACIÓN DE LOS EMBRIONES	83
1.4. DETECCIÓN DEL EMBARAZO	84
1.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	85
RESULTADOS	89
1.1. DESCRIPTIVOS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	89
VARIABLES DEL BLOQUE 1.....	89
VARIABLES DEL BLOQUE 2.....	90
1.2. PRIMER ANÁLISIS: COMPARACIÓN ESTADÍSTICA DE MEDIAS Y PROPORCIONES ...	93
OVOCITOS PROPIOS	93
RECEPCIÓN DE OVOCITOS.....	105
FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO (IFE)	107
1.3. SEGUNDO ANALISIS: REGRESIONES LOGISTICAS BINARIAS	112
COVARIABLE 1: ORIGEN DE LOS OVOCITOS	113
COVARIABLES 2 Y 3: CALIDAD SEMINAL E IFE	114
COVARIABLE 4: CALIDADES EMBRIONARIAS EN DÍA +3 Y +5	116
1.4. TERCER ANÁLISIS: CURVAS ROC	119
CALIDADES EMBRIONARIAS EN DÍA +3 <i>VERSUS</i> DÍA +5.....	119

COMBINACIÓN DE VARIABLES CON VALOR PREDICTIVO	123
DISCUSIÓN	127
CONCLUSIONES	161
ABREVIATURAS	165
BIBLIOGRAFÍA	171
ANEXOS	187

RESUMEN

RESUMEN

Introducción

La eficacia de los tratamientos de reproducción asistida (TRA) aumenta con el desarrollo científico y tecnológico. Este hecho ha provocado una revolución mundial en la reproducción humana proporcionando una gran esperanza tanto al 15% de las parejas con problemas de fertilidad, como a pacientes oncológicos, sin pareja, parejas del mismo sexo, pacientes con enfermedades hereditarias o aquellos que desean acelerar o retrasar su planificación familiar.

La reproducción comienza con la formación de los gametos mediante la espermatogénesis y ovogénesis y, termina con la creación de un cigoto, la primera célula de un nuevo individuo.

El ovocito humano se fecunda en las trompas de Falopio y se va desarrollando durante su transporte hacia el útero, donde se implantará en estadio de blastocisto. El estadio de blastocisto es la fase del embrión por sí solo más evolucionada, reconociéndose como la fase previa a la implantación en el endometrio materno. Tanto el genoma del ovocito como del espermatozoide participan por igual en la creación del genoma embrionario, aunque éste no será activo hasta el día +3 de desarrollo.

En el blastocisto se puede observar un mayor grado de diferenciación celular, distinguiéndose dos poblaciones de células: las células del trofoectodermo (TE), aquellas que forman la propia estructura del embrión y, las células de la masa celular interna (MCI), situadas dentro del blastocele.

El cultivo de blastocistos o cultivo largo puede considerarse como parte de la selección natural que sufren los embriones durante su desarrollo los cinco o seis primeros días, siendo aquellos que llegan a dicho estadio, los que tienen mayores probabilidades de implantación y embarazo tras la transferencia. Este hecho es debido al mayor grado de diferenciación celular y, al hecho de que el genoma embrionario comience a funcionar a partir de día +3.

Por tanto, las principales ventajas del cultivo y transferencia de blastocistos implican: la sincronización del embrión con el tracto femenino y la evaluación de la viabilidad del embrión propiamente dicho antes de la transferencia. Por el contrario, la mayor preocupación del cultivo largo radica en las diferencias entre las condiciones *in vitro* e *in vivo* que pueden producir que

RESUMEN

algunos embriones viables puedan detener su desarrollo debido a imperfecciones del sistema *in vitro*. No existe un consenso claro para decidir transferir los embriones en día +3 o llevarlos a cultivo largo y transferirlos en día +5, aunque hay una tendencia lógica a dejarlos a cultivo largo cuando hay un mayor número de embriones en día +3.

Habitualmente, lo común había sido transferir en día +2 o +3 de desarrollo. Sin embargo, los grupos que tuvieron la logística necesaria para cultivar los embriones hasta día +4 o +5, observaron tasas de gestación clínica y evolutiva hasta dos veces superiores que las conseguidas con embriones en día +2 o +3.

Desde los inicios de la FIV en humanos, la morfología embrionaria ha sido el principal método utilizado por los embriólogos para evaluar el desarrollo y seleccionar el mejor/es embrión/es para transferir o criopreservar. Aunque, cabe destacar que, la observación de la morfología embrionaria hasta día +3 de desarrollo se basa más en la propia morfología del ovocito que en la verdadera fisiología del embrión.

El verdadero determinante del potencial de un embrión son los gametos de los que se deriva. Hay un porcentaje significativo de gametos que son cromosómicamente anormales, en el caso de las mujeres aproximadamente el 25% de los ovocitos de un TRA son aneuploides y la frecuencia de esta anomalía, aumenta con la edad materna. En el caso de los hombres, no todos los espermatozoides son cromosómicamente competentes. Por estas razones, un porcentaje significativo de embriones concebidos mediante ICSI no alcanzarán la etapa de blastocisto, es decir, no van a estar destinados a formar un embrión viable, sino que serán eliminados naturalmente y no llegaran a transferirse. Estos embriones, son aquellos que estaban gravemente anormales desde un punto de vista genético o que no fueron capaces de activar su genoma embrionario. Sin embargo, esto no garantiza que todos los embriones que llegan blastocisto sean genéticamente normales.

Después de la fecundación, el ooplasma se convierte en el citoplasma del embrión, mientras que la participación del espermatozoide hasta el comienzo de la activación del genoma embrionario es mínima. Por esta razón, la calidad de los ovocitos es un factor clave para determinar la calidad de los primeros pasos del desarrollo embrionario.

La edad femenina en sí misma es uno de los factores predictivos más relevantes para la consecución del embarazo. Existe una disminución natural de la fertilidad femenina con el aumento de la edad materna y, el punto de inflexión parece estar en los 35 años. Una posible

RESUMEN

explicación a este fenómeno reside en la disminución de la reserva ovárica o el envejecimiento de los ovocitos.

Las opciones para tratar la infertilidad relacionada con la edad incluyen la hiperestimulación ovárica controlada y la donación de ovocitos, sobre todo para las mujeres mayores de 40 años o aquellas con una reserva ovárica disminuida.

De manera tradicional, la infertilidad masculina se ha evaluado con un análisis de semen de rutina, en el que se incluye el estudio de la concentración, motilidad y morfología espermática. Sin embargo, los criterios establecidos para la normalidad de dichos parámetros seminales, ofrecen un valor pronóstico limitado en la predicción de los resultados de un TRA. Por esta razón, últimamente, el índice de fragmentación del ADN espermático (IFE) también ha ganado un gran valor diagnóstico.

Según algunos estudios, la capacidad de la técnica de ICSI para esquivar calidades seminales alteradas hace que, la tasa de fecundación, la división del embrión y la consecución del embarazo sean independientes de los parámetros seminales. Esto es debido a que se consigue seleccionar el espermatozoide con mejor aspecto morfológico y motilidad de los que hay disponibles, sea cual sea la calidad seminal. Aunque, hay que tener en cuenta que, actualmente hay evidencias de que los espermatozoides con el ADN fragmentado pueden estar vivos, ser morfológicamente normales y capaces de fecundar al ovocito.

Por tanto, el daño en el ADN espermático es una causa de infertilidad importante y tiene un gran valor diagnóstico y pronóstico en comparación con otros parámetros seminales de rutina.

Varios autores han reportado una correlación negativa entre el IFE alterado y los resultados en los TRA, observándose una disminución de los mismos. Aunque la verdadera importancia clínica del daño en el ADN espermático aún no se ha establecido por completo ya que los estudios disponibles son muy heterogéneos.

Ahora bien, hay evidencia de que el ovocito es capaz de reparar en cierta medida el daño en el ADN del espermatozoide, aunque esta reparación está asociada con el tipo de daño y con la calidad del ovocito. Por consiguiente, en los ovocitos y embriones, la reparación del ADN espermático es probablemente uno de los procesos más importantes que se deben realizar tras la fecundación, para permitir un desarrollo embrionario completo.

RESUMEN

Con lo cual, con todo lo mencionado anteriormente, creemos que sería una buena oportunidad evaluar cuales son los factores que influyen de un modo más determinante en el cultivo largo a blastocisto en nuestro centro y analizar los resultados obtenidos. Por todo ello, durante el desarrollo de este trabajo nos planteamos las posibles repercusiones que tiene el origen de los ovocitos (ovocitos propios o donados), la calidad seminal y el IFE en el cultivo a blastocisto y la consecución del embarazo. Así como, valorar si las calidades embrionarias propuestas en día +3 pudieron pronosticar las calidades en día +5, además de analizar qué pacientes se vieron beneficiados del cultivo largo.

Hipótesis

El ovocito humano se fecunda en las trompas de Falopio y se va desarrollando durante su transporte hacia el útero donde se implantará en fase de blastocisto. La evaluación morfológica de embriones en este estadio de desarrollo es la forma más adecuada para estudiar cómo influye el factor femenino y masculino en el embrión, ya que, el genoma embrionario empieza a funcionar a partir de día +3, pudiendo de esta manera, evaluar el embrión propiamente dicho, mientras que hasta día +3, principalmente es competencia del ovocito. Por tanto, cabe esperar que sea el ovocito el que tuviera un mayor impacto sobre el embrión. Aún así, es importante destacar también que, los espermatozoides con altos niveles de ADN fragmentado se correlacionan con una disminución de la tasa de fecundación y llegada a blastocisto, aunque el ovocito es capaz de reparar en cierta medida dicho daño espermático. Por tanto, la calidad del material genético de los espermatozoides también podría convertirse en un factor pronóstico.

El objetivo general del presente trabajo fue estudiar cómo influyó el factor femenino y masculino en el en el desarrollo embrionario hasta blastocisto y cómo de determinantes fueron en la consecución del embarazo. Teniendo en cuenta que, el cultivo largo nos proporciona por un lado, una información adicional que mejora la selección de los embriones a transferir aumentando así, la tasa de gestación evolutiva y, por otro lado, transferir blastocistos consigue una mejor sincronía endometrial, en el presente trabajo también se profundizó en los mecanismos implicados en dichos efectos.

Objetivos

Para ello, mediante un estudio prospectivo no randomizado y, utilizado ciclos de ICSI con cultivo largo, se plantearon los siguientes objetivos:

RESUMEN

1. Evaluar el factor ovocitario y ver cómo influye la edad materna en el desarrollo de los embriones desde día +1 hasta día +5 o +6, así como, en la consecución del embarazo.
2. Evaluar el factor masculino y ver cómo se relaciona la calidad seminal en el desarrollo de los embriones desde día +1 hasta día +5 o +6, así como, en la consecución del embarazo.
3. Estudiar y analizar el efecto de la fragmentación del ADN espermático (IFE) en el desarrollo del embrión y la capacidad del ovocito para reparar dicho daño espermático.
4. Evaluar si las calidades embrionarias propuestas en día +3 de desarrollo pueden pronosticar las calidades en día +5.
5. Evaluar qué tipo de pacientes se ven beneficiados al realizar cultivo largo.

Materiales y métodos

Se seleccionaron de forma prospectiva y no randomizada todos los ciclos de cultivo largo realizados en GINEFIV, durante el periodo comprendido entre Enero de 2012 y Septiembre de 2015. El resultado de dicha selección fue 662 pacientes que llevaron sus embriones a día +5 o +6 de desarrollo generando 2898 embriones en estado de blastocisto que, o bien se transfirieron ese mismo ciclo, o bien se vitrificaron para futuros tratamientos.

Se incluyeron tanto los ciclos con ovocitos propios y donados, como los ciclos con semen homólogo y heterólogo. Las pacientes con ovocitos propios, además de haber sido sometidas a una estimulación ovárica controlada, también se sometieron a una preparación endometrial mediante la administración de gonadotropinas. Las receptoras de ovocitos únicamente se sometieron a la preparación endometrial.

Durante la estimulación ovárica se emplearon hormonas liberadoras de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) para conseguir un reclutamiento folicular múltiple y por consiguiente, un mayor número de ovocitos maduros durante la punción ovárica.

Las pacientes con ovocitos propios fueron aquellas con patología tubárica, endometriosis, fallo de inseminación artificial, factor masculino, esterilidad de origen desconocido, fallo ovárico o disminución de la reserva ovárica.

RESUMEN

Entre las indicaciones para ser receptoras de ovocitos estuvieron la menopausia, fallo ovárico precoz, fallo ovárico por quimioterapia o radioterapia, ser portadoras de alteraciones genéticas o tener disgenesias gonadales, haber sufrido fallos repetidos de FIV por causa ovocitaria, factor etario, baja respuesta y/o ovarios inaccesibles.

Todas las muestras seminales fueron obtenidas por masturbación el mismo día de la punción o días previos. Si la muestra se obtuvo días previos, se congeló hasta el día de su utilización. Se realizó un seminograma previo para realizar un diagnóstico de las muestras siguiendo los valores de referencia establecidos por el manual de la OMS de 2010. Todas las muestras se capacitaron y, tras la capacitación, se realizó el *swim-up* para recuperar solo aquellos espermatozoides con mejor motilidad.

El análisis del IFE se realizó por citometría de flujo, técnica que mide el porcentaje de espermatozoides con roturas en la cadena de ADN mediante su desnaturalización inducida por un pH bajo. Se expresa como índice de fragmentación del ADN espermático (IFE) y es una medida precisa y repetible. Se consideró una muestra alterada cuando el IFE fue igual o superior al 27%.

Los cúmulos obtenidos en la punción ovárica se mantuvieron hasta el proceso de decumulación en medio de cultivo G-IVFTM PLUS (VITROLIFE) cubierto con aceite de parafina filtrado (OVOILTM, VITROLIFE). Previamente a la ICSI, se realizó la decumulación de los cúmulos usando hialuronidasa (HYASETM-10X, VITROLIFE) y medio tamponado (G-MOPSTM PLUS, VITROLIFE) en una relación 1:9. Únicamente los óvulos en estadio de metafase II (MII) fueron destinados al proceso de microinyección.

El proceso de microinyección se realizó con la ayuda de micropipetas HUMAGENTM (Fertility Diagnostics) a 37°C. Los óvulos microinyectados se cultivaron de forma individualizada en microgotas de G-1TM v5 PLUS (VITROLIFE) cubiertos con aceite OVOILTM (VITROLIFE) y, se mantuvieron en cultivo en las estufas incubadoras con trigas.

La división de los cigotos se evaluó siguiendo las pautas de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR). En el estudio se recogieron los datos de las cuatro calidades en día +3 y +5 de desarrollo, además del tipo de blastocisto que llegaron a formar y posteriormente transferir. La transferencia intrauterina ecoguiada se realizó en día +5 de desarrollo mediante sondas Gynetics (GYNÉTICS MEDICAL PRODUCTS) o Labotect (LABOTECT), según la facilidad de acceso al útero.

RESUMEN

A los 14 días tras la transferencia embrionaria, la detección en sangre de la gonadotropina coriónica humana (β -HCG) mostró la presencia de gestación positiva. Las pacientes fueron citadas para controles ecográficos y se recogió la presencia de saco gestacional (SG) y latido cardíaco fetal (LCF). Posteriormente, se mantuvo un registro de las gestaciones evolutivas que llegaron a término.

El análisis estadístico se realizó mediante el programa informático SPSS 23.0. La significación estadística se determinó como $p < 0,05$. Se analizaron las diferencias estadísticamente significativas en las variables para la comparación de medias y proporciones. Además, se realizaron modelos de regresión logística binaria para ver qué variables fueron las que influyeron significativamente en la tasa de llegada a blastocisto y la tasa de gestación clínica y, modelos de curvas ROC (*receiver operating characteristic curve*) para las calidades embrionarias en día +3 y +5. Dentro de este análisis, se combinaron también distintas variables (datos no mostrados) hasta dar con una combinación con un valor predictivo significativo. Todos los resultados fueron calculados por transferencia realizada y siguiendo la recomendación de Zegers-Hochschild y colaboradores 2009.

Resultados

Cuando se compararon estadísticamente las medias y proporciones de las variables analizadas, el grupo de pacientes que usaron sus propios ovocitos se dividió en cinco subgrupos atendiendo a la edad materna y se compararon en función de la calidad seminal.

De tal manera que cuando se usó donante de semen, se observó que la tasa de fecundación fue significativamente mayor en el grupo de edad materna de 40-45 años. Sin embargo, la tasa de llegada a blastocisto fue significativamente menor a partir de 30-35 años y la tasa de gestación evolutiva disminuyó estadísticamente a partir de los 40 años.

Cuando la calidad seminal fue normozoospermica, la tasa de llegada a blastocisto fue significativamente menor a partir de los 40 años. No obstante, la tasa de gestación clínica y evolutiva fue significativamente mayor en las pacientes mayores de 40 años que en las pacientes entre 35-40 años.

Cuando la calidad fue no normozoospermica, no se observaron diferencias significativas en la tasa de llegada a blastocisto aunque la tasa de gestación clínica y evolutiva fue significativamente mayor en el grupo de pacientes menores de 30 años.

RESUMEN

Cuando la calidad seminal tuvo como parámetro común alterado la teratozoospermia, la tasa de llegada a blastocisto fue significativamente menor a partir de los 40 años. Mientras que, la tasa de gestación clínica y evolutiva fue significativamente mayor en las pacientes menores de 30 años.

Por último, cuando la calidad seminal tuvo todos los parámetros alterados a la vez (oligo-terato-asteno-necrozoospermia (OTAN)), la tasa de llegada a blastocisto y la de gestación clínica y evolutiva fueron estadísticamente menores a partir de los 35 años.

Sin embargo, cuando la comparación de medias y proporciones se realizó en las receptoras de ovocitos, no se observaron diferencias significativas en ninguna de las variables estudiadas en función de las calidades seminales.

Cuando se tuvo en cuenta el IFE, se observó que hubo significativamente un mayor número de muestras normozoospermicas con un IFE normal. En contraste, hubo significativamente más muestras con la morfología alterada y OTAN con un IFE alterado.

Cuando se estudió la influencia del IFE en las pacientes con ovocitos propios, se analizó por un lado el factor etario utilizando muestras con IFE normal o alterado. En este análisis no se encontraron diferencias significativas entre ser mayor o menor de 35 años. Por otro lado, se analizaron también las diferencias significativas entre tener un IFE normal o alterado en pacientes menores de 35 años y mayores de 35 años. En este caso se observaron diferencias significativas a favor de las muestras con un IFE alterado en el número de embriones en día +3 en pacientes mayores de 35 años y en la tasa de gestación clínica en pacientes menores de 35 años.

Sin embargo, cuando las pacientes fueron receptoras de ovocitos y se quiso analizar la influencia del IFE, se observaron diferencias significativas en la tasa de gestación clínica, siendo ésta mayor cuando el IFE fue normal.

En un segundo análisis estadístico se realizaron modelos de regresión logística binaria para dos variables dependientes: la llegada a blastocisto de al menos el 60% de los embriones y la consecución de la gestación clínica, ambas en función de variables predictivas.

Cuando la variable predictiva fue el origen de los ovocitos, se observó que las receptoras de ovocitos tuvieron un valor predictivo significativo a favor de ambas variables dependientes.

RESUMEN

Las pacientes menores de 30 años que usaron sus ovocitos también mostraron un valor predictivo significativo a favor de las variables dependientes.

Por el contrario, cuando la calidad seminal actuó como variable predictiva, únicamente se observó que las muestras normozoospermicas, en el grupo de pacientes con ovocitos propios menores de 35 años, tuvieron un valor predictivo significativo que pronosticó la llegada a blastocisto de al menos el 60% de los embriones.

Cuando las variables predictivas fueron las calidades embrionarias propuestas en día +3 y +5, se observó que en las receptoras de ovocitos y en las pacientes con ovocitos propios mayores de 35 años, las calidades propuestas en día +5 tuvieron un mayor valor predictivo que las calidades en día +3 para ambas variables dependientes. Sin embargo, en las pacientes con ovocitos propios menores de 35 años, las calidades propuestas en +3, concretamente la calidad C, tuvo mayor valor predictivo que las calidades propuestas en día +5 en la consecución de la gestación clínica.

Por último, cuando las pacientes con ovocitos propios mayores de 35 años fueron capaces de formar blastocitos de tipo expandido y eclosión, tuvieron un valor predictivo significativo a favor de la consecución de la gestación clínica.

Conclusiones

En nuestro estudio, donde se valoró la influencia del factor femenino y masculino en la llegada al estadio de blastocisto y la consecución del embarazo, presentamos las siguientes conclusiones:

1. Según nuestros datos, el origen de los ovocitos (donados o propios) tuvo mayor valor predictivo que la calidad seminal cuando se realizó una ICSI.
2. Los pacientes con ovocitos propios mayores de 35 años y las receptoras de ovocitos, se beneficiaron del cultivo largo. Para ambos grupos de pacientes las calidades embrionarias propuestas en día +5 tuvieron mayor valor predictivo que las calidades en día +3.
3. Sin embargo, en las pacientes con ovocitos propios menores de 35 años, el cultivo largo no les confirió un beneficio adicional al que ya tiene de por sí: tener mayor información para realizar una selección embrionaria más acertada que en día +3.

RESUMEN

4. Los datos analizados no permiten recomendar el IFE como una prueba de rutina añadida en todos los pacientes, ya que los métodos de capacitación y la técnica ICSI, tienden a reducir el número de espermatozoides con IFE alterado. Además, el hecho de no haber encontrado diferencias significativas en la tasa de llegada a blastocisto pero sí en la de gestación clínica en los pacientes con un IFE alterado, nos lleva a suponer que el efecto de la fragmentación espermática se manifieste más allá del estadio de blastocisto. Por tanto, estos pacientes no se verán más beneficiados del cultivo largo que otros pacientes con un IFE normal.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La eficacia de los tratamientos de reproducción asistida (TRA) aumenta con el desarrollo científico y tecnológico. Este hecho ha provocado una revolución mundial en la reproducción humana proporcionando una gran esperanza tanto al 15% de las parejas con problemas de fertilidad, como también a pacientes oncológicos, personas sin pareja, parejas del mismo sexo, personas con enfermedades hereditarias o aquellas que desean acelerar o retrasar su planificación familiar.

La fecundación *in vitro* (FIV) en sus comienzos, suscitaba cierta preocupación por las consecuencias desconocidas para la salud de los bebés nacidos a partir de ella. Sin embargo, gracias a los éxitos iniciales y los niños sanos nacidos a finales de los años setenta, se reemplazaron rápidamente estos temores y, a día de hoy, la FIV se considera un adelanto médico que da como resultado el nacimiento de aproximadamente 350.000 bebés en el millón y medio de TRA que se realizan anualmente en el mundo (1).

Nuestro conocimiento en reproducción humana se remonta a Hipócrates (siglo V a.C.) donde se creía que tanto machos como hembras producían unos licores seminales y la mezcla entre ambos produciría un nuevo individuo. Un siglo más tarde, Aristóteles propuso que la primera etapa del ser humano se debía producir en forma de huevo en las hembras y era el espermatozoide el que podía dar forma a ese huevo (2).

Durante siglos, la gente vivió con este concepto, incluso después de que De Graaf describiese el folículo en 1672 y Leeuwenhoek el espermatozoide en 1677. En 1790 Spallanzani se dio cuenta que el contacto entre los gametos era fundamental para lograr la fecundación e iniciar el desarrollo embrionario (3). De hecho, en 1786, Hunter realizó la primera inseminación artificial en humanos, y en 1866 Sims hizo la primera inseminación con un donante de semen.

En 1903 Johannsen, acuñó el término "gen", y Bateson definió 3 años más tarde la "genética" como ciencia. 50 años después, en 1953, Watson, Crick y Wilkins descubrieron la estructura de doble hélice del ADN y en 1956 Tijo y Levan identificaron los 46 cromosomas del ser humano.

Un año más tarde, Thibault logró la primera FIV en un mamífero, el conejo. Gracias a este hallazgo, la sociedad científica comenzó a sentir interés por la infertilidad humana,

INTRODUCCIÓN

celebrándose el primer congreso sobre infertilidad en 1959 en Nueva York. En 1960, Gemzell y Lunenfeld obtuvieron los primeros embarazos tras el tratamiento con gonadotropina pituitaria humana (hPG) y gonadotropina menopáusica humana (hMG) y, en 1961, Klein y Palmer describieron la primera aspiración de un ovocito humano por laparoscopia (4). Pero no fue hasta 1965, cuando Edwards determinó que los ovocitos humanos extraídos de las biopsias ováricas requerían 37 horas para completar su maduración *in vitro*.

Edwards siguió trabajando para hacer funcionar en seres humanos lo que se observaba en modelos animales y se asoció con el ginecólogo Steptoe en 1968. Diez años más tarde consiguieron que se produjera el primer nacimiento humano de la historia de la reproducción asistida (RA) mediante una FIV, el de Louise Brown el 25 de julio de 1978. El embrión que dio lugar a Brown fue conseguido a través de un ciclo natural y no estimulado (5).

Tras este primer éxito, en Francia, Suecia, Finlandia, Países Bajos, Alemania, Reino Unido, Estados Unidos y Australia empezaron a reportar otros nacimientos. En 1981 se organizó una reunión para aquellos grupos que querían reportar sus resultados. De esta reunión también surgió una importante conclusión: la preferencia por los ciclos estimulados, lo que generaría más ovocitos y permitiría una mejor predicción de la ovulación. Sin embargo, se empezó a observar que el número de embarazos múltiples aumentaba, convirtiéndose en un verdadero problema. Por esta razón, Reino Unido fue el primer país en introducir una legislación y reglamentar los TRA.

En 1992, la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) se convertiría en una técnica muy exitosa descrita por el grupo de Palermo y Van Steirteghem (6), abriendo así, una nueva puerta para el tratamiento de la infertilidad masculina. Tras el éxito de la ICSI, en 1994 se consiguió un embarazo utilizando espermatozoides extraídos de testículos o epidídimo. Unos años más tarde, en 1997 se hizo la primera transferencia de embriones en estadio de blastocisto. En 2001 se empezaron a realizar transferencias de un único embrión y en 2004 tuvo lugar el primer embarazo de tejido ovárico congelado (7, 8).

Hoy en día, los TRA se usan en todo el mundo y la mayoría de países han adoptado una legislación específica sobre la utilización de los mismos. Estas legislaciones son regionalmente distintas por motivos culturales, religiosos y/o morales (9).

En España se aprobó la Ley 35/1988, de 22 de noviembre, sobre técnicas de reproducción asistida. Esta ley fue una de las primeras en entrar en vigor y, aunque supuso un gran avance científico y clínico, el desarrollo de nuevas técnicas de reproducción, el aumento

INTRODUCCIÓN

del potencial investigador y la necesidad de dar respuesta al problema del destino de los preembriones generados, hicieron necesaria una reforma que tuvo como conclusión la Ley 45/2003, de 21 de noviembre. Dicha ley autorizó la utilización con fines de investigación, de los preembriones que se encontraban criopreservados con anterioridad a su entrada en vigor, posibilidad vetada a los embriones generados con posterioridad y que, podrían destinarse únicamente a fines reproductivos de la pareja generadora o a la donación a otras parejas. Por otro lado, dicha ley establecía la limitación de producir un máximo de tres ovocitos por ciclo.

La Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida se mostró particularmente crítica con esta reforma e insistió en volver a reformarla con el fin de corregir las deficiencias advertidas y acomodarla a la realidad actual. Como consecuencia, se aprobó la Ley 14/2006, de 26 de mayo, que corrige los problemas suscitados por la legislación anterior, eliminando las diferencias de consideración de los preembriones criopreservados y eliminando los límites para la generación de ovocitos por ciclo. Dicha ley define el concepto de “preembrión” que sigue un criterio mucho más abierto permitiendo evitar, en ciertos casos, la aparición de determinadas enfermedades genéticas mediante el diagnóstico genético preimplantacional (DGP). Por último, dicha ley también creó el registro de actividad de los centros de reproducción asistida (10).

Algunos países han creado entidades específicas que regulan y supervisan las cuestiones relacionadas con los TRA, concretamente en España, se cuenta con la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR). Se trata de una asociación creada en 1993 que, ante la falta de consenso entre los distintos equipos, definió en 2008 unos criterios morfológicos de valoración de la calidad y clasificación en escalas para cada uno de los estadios embrionarios (11). Estos criterios fueron actualizados en 2015 y han sido seguidos en este trabajo (12).

La reproducción se basa en un proceso complejo que comienza con la formación de los gametos (espermatogénesis y ovogénesis) y termina con la creación de un cigoto, la primera célula de un nuevo individuo.

La gametogénesis implica la realización de la meiosis, proceso de división celular que comprende dos mitosis dando como resultado la formación de espermatozoides y ovocitos haploides. La maduración de los espermatozoides ocurre al final de la espermatogénesis, mientras que los ovocitos, se encuentran en un estado de inactividad meiótica que solo puede ser reanudado por la interacción con un espermatozoide (13).

Los espermatozoides con el fin de asegurar la fecundación del ovocito a través del tracto reproductivo femenino, van sufriendo cambios en la motilidad, morfología, quimiotaxis, y

INTRODUCCIÓN

acrosoma mediante un fenómeno denominado capacitación espermática. Una vez llegan al ovocito y penetra un único espermatozoide en su interior, se producen una serie de procesos ordenados que comienzan por la fusión de sus membranas plasmáticas, expulsión del segundo corpúsculo polar (CP) por parte del ovocito, descondensación de la cabeza del espermatozoide, formación de los pronúcleos (PN) con su posterior aumento de tamaño y, por último, la ruptura de la membrana pronuclear y su desaparición. Paralelamente, los cuerpos precursores nucleares (CPN) están en movimiento dentro de los PN hasta que éstos desaparecen con ellos. Tras todos estos sucesos, se produce una activación recíproca de ambos gametos, con modificaciones eléctricas, estructurales y metabólicas en el ovocito que dan lugar a una fecundación satisfactoria y al comienzo del desarrollo embrionario (3).

El ovocito humano se fecunda en las trompas de Falopio y se va desarrollando durante su transporte hacia el útero, donde se implantará en estadio de blastocisto (14,15). El estadio de blastocisto es la fase del embrión por sí solo más evolucionada, reconociéndose como la fase previa a la implantación en el endometrio materno (16).

Tanto el genoma del ovocito como del espermatozoide participan por igual en la creación del genoma embrionario, aunque éste no será activo hasta el día +3 de desarrollo. De esta manera, durante los tres primeros días, el desarrollo embrionario es controlado principalmente por el ARN mensajero (ARNm) presente en el citoplasma del ovocito (17) y, no es hasta después de la compactación de las blastómeras cuando el embrión se desarrolla bajo el control del genoma embrionario activado (3).

Por esta razón, el período preimplantacional comprende dos fases: la precompactación y postcompactación. En la primera fase, que comprende los 3-4 primeros días, el embrión presenta niveles relativamente bajos de biosíntesis, bajas tasas respiratorias y una limitada capacidad para usar glucosa como fuente de energía. Sin embargo, en la segunda fase, a partir de día +4 de desarrollo, cuando el embrión aumenta su número de células hasta formar una mórula, las tasas biosintéticas se ven aumentadas, al igual que la capacidad para usar glucosa y la tasa respiratoria (18). La mórula formada en este estadio sufrirá una compactación de todas sus células dando lugar a una mórula compacta que, tras organizarse, empezará a cavitarse y formar un blastocisto.

De todos los estadios de desarrollo, el estadio de mórula es el menos definido, aunque la compactación que sufre tiene una gran influencia sobre la forma en la que el embrión se desarrolla hasta blastocisto (19). Durante la compactación, los blastómeros van estableciendo

INTRODUCCIÓN

uniones estrechas que facilitan la formación del primer epitelio (20). El embrión necesita un epitelio competente, ya que tiene que crear un gradiente iónico que permita que el líquido se vaya acumulando en el interior de la mórula. De esta manera, el embrión en este estadio comienza a controlar su ambiente interno facilitando la formación del blastocele (21). A medida que el volumen de líquido aumenta, el embrión se va expandiendo aumentando el número de células y provocando un adelgazamiento progresivo de la zona pelúcida (ZP). De esta manera, el blastocisto se colapsa y se re-expande hasta que, finalmente, consigue liberarse de la ZP a través de un proceso llamado eclosión (22).

Una vez que el blastocisto ha conseguido expandirse, se puede observar un mayor grado de diferenciación celular distinguiéndose dos poblaciones de células: las células externas del blastocisto, que forman la propia estructura del embrión y son las denominadas células del trofoectodermo (TE) y, las células situadas dentro del blastocele, que a menudo están en grupo en un polo del embrión y son las denominadas células de la masa celular interna (MCI) (23).

El destino final de la MCI es convertirse en el embrión propiamente dicho. Sin embargo, las células del TE, aunque son imprescindibles para la formación del blastocele y la liberación de la ZP, toman mayor relevancia durante y después de la implantación, ya que juegan un papel clave en la aposición, adhesión e invasión del endometrio, permitiendo que el blastocisto se implante correctamente en el útero. Además, estas células producen factores moleculares que ayudan durante la implantación y, su destino final es convertirse en las membranas fetales extra-embrionarias, como la placenta (24).

En los años 90, era complicado mantener a los embriones en cultivo durante más de 48 horas sin comprometer su viabilidad. Por ello, habitualmente lo común había sido transferir en día +2 o +3 de desarrollo (23). Sin embargo, es importante tener en cuenta que, *in vivo*, los embriones en estos estadios se encuentran todavía en las trompas de Falopio y no en el útero (25). De hecho, los grupos que tuvieron la logística necesaria para cultivar los embriones hasta día +4 o +5, observaron tasas de gestación clínica y evolutiva más altas cuando transferían blastocistos en día +4 o +5 de desarrollo (26, 27), describiéndose tasas hasta dos veces superiores que las conseguidas con embriones en día +2 o +3 (28). Por tanto, se sabe desde hace años que, las transferencias embrionarias en etapa de blastocisto aumentan las tasas de implantación y gestación por embrión transferido (29, 30).

El cultivo de blastocistos o cultivo largo puede considerarse como parte de la selección natural que sufren los embriones durante su desarrollo los cinco o seis primeros días, siendo

INTRODUCCIÓN

aquellos que llegan dicho estadio los que tienen mayores probabilidades de implantación y embarazo tras la transferencia (31). Este hecho es debido al mayor grado de diferenciación celular y, al hecho de que el genoma embrionario comience a funcionar a partir de día +3.

De esta manera, el principal objetivo del cultivo de blastocistos fue aumentar la tasa de éxito mejorando la selección de aquellos embriones activados genéticamente y consiguiendo además, una mejor sincronía endometrial (32, 33). Asimismo, al permitir seleccionar únicamente aquellos embriones más viables de un ciclo, se consigue reducir el número de embriones a transferir, disminuyendo la incidencia de gestaciones múltiples. Hoy en día, las transferencias de un único embrión se han convertido en la meta de los TRA (34, 35, 36, 37).

Por todos estos motivos, en la última década ha aumentado la tendencia a transferir en estadio de blastocisto en vez de en día +2 o +3 y, un componente clave que ha permitido llevar a cabo este cambio, ha sido la nueva generación de medios de cultivo. Este avance aumentó drásticamente el porcentaje de embriones que llegaron a blastocisto y por consiguiente, la tendencia a transferir embriones en este estadio de desarrollo (23, 38).

Cuando se habla de medios de cultivo es importante diferenciar entre la capacidad de un medio para soportar el desarrollo del blastocisto *in vitro* y, la capacidad de dicho medio para dar lugar a un blastocisto viable (39).

Es importante tener en cuenta que el ambiente óptimo para que un embrión se desarrolle hasta blastocisto es el tracto femenino. Por tanto, los medios de cultivo han de reproducir tanto los cambios que se producen en la fisiología del embrión a medida que avanza en su desarrollo, como los cambios dentro del tracto reproductivo femenino, además de minimizar el estrés celular que implica el propio cultivo (cambios de pH intracelular o choque osmótico). El embrión en cultivo es muy sensible a los cambios de temperatura y pH, de hecho, cuando alguno de estos parámetros se ve alterado, disminuirá su tasa de división celular (19, 22, 40).

Se cree que el embrión humano es más susceptible a este tipo de estrés antes de la compactación. Como ya se ha mencionado anteriormente, durante la compactación comienza la activación del genoma embrionario y la generación del primer epitelio de transporte. En este periodo el embrión aún no es capaz de regular por sí mismo su ambiente interno. Sin embargo, tras la compactación, el embrión ya es capaz de regularse y no es tan dependiente de los factores externos. Por tanto, los requerimientos del embrión deben ser diferentes antes y después del estadio de mórula (14,41). Además, es importante tener en cuenta que el embrión *in vivo* en

INTRODUCCIÓN

fase de cuatro a ocho células reside en las trompas de Falopio, y sólo penetra en el útero en estadio de blastocisto. Por tanto, la exposición prematura de los embriones en las transferencias de día +2 y +3 podrían comprometer el correcto desarrollo del embrión y su viabilidad (42).

Tomando en cuenta tales factores, ha sido posible formular medios de cultivo capaces de permitir el desarrollo embrionario desde pronúcleos hasta blastocistos. Además, el crecimiento óptimo del embrión requiere el uso de más de un medio de cultivo para satisfacer sus necesidades (14). Para ello, se han formulado dos medios de cultivo basados en los niveles de metabolitos presentes en el tracto reproductor femenino: el medio G1, diseñado para mantener el embrión durante las primeras 72 horas de desarrollo y, el medio G2, que mantiene al embrión hasta su estadio más avanzado, el de blastocisto (día +5 o +6) (43).

Otro aspecto muy importante a tener en cuenta en el cultivo de blastocistos, es la atmósfera donde se incuban. De manera tradicional, los embriones se incubaban en una atmósfera al 5% de dióxido de carbono (CO_2) con aproximadamente el 20% de oxígeno (O_2). Hoy en día se conoce que cuando la concentración de O_2 es del 20%, se retarda el desarrollo a blastocisto comprometiendo su MCI (22).

Este retraso en el desarrollo se debe a que la concentración de O_2 es mayor que la que fisiológicamente existe en el oviducto y el útero, lo que promueve la generación de radicales de O_2 altamente reactivos y citotóxicos, perjudiciales para el embrión (43). Los estudios en modelos animales han estimado que las concentraciones fisiológicas de O_2 en el oviducto y útero estén entre el 5 y el 10% (44). Para conseguir dichas concentraciones de O_2 *in vitro*, la incubación de los embriones durante los 5 ó 6 primeros días debe ser en ambientes donde el CO_2 en el aire sea del 6%, el O_2 del 5% y el nitrógeno (N_2) del 90% (45). Esta mezcla óptima de gases logra gracias al aumento de la presión parcial del N_2 , desplazar a los demás gases presentes en el aire consiguiendo que, el O_2 este al 5%, hecho que optimiza el desarrollo a blastocisto de los embriones (45, 46).

La selección del embrión con mayor potencial de desarrollo de toda la cohorte del ciclo es esencial para lograr un embarazo exitoso (35, 45). Para la identificación de dicho embrión se requiere algún parámetro cuantificable y, en el caso del embrión humano, éstos tienen que ser no invasivos. Ni siquiera la incubación de embriones con algún colorante vital puede ser considerada. Únicamente la morfología del embrión ha sido convencionalmente el criterio más utilizado.

INTRODUCCIÓN

Por tanto, desde los inicios de la FIV en humanos, la morfología embrionaria ha sido el principal método utilizado por los embriólogos para evaluar el desarrollo y seleccionar el mejor/es embrión/es para transferir o criopreservar (47, 48). Aunque, cabe destacar que la observación de la morfología hasta día +3 de desarrollo, se basa más bien en la propia morfología del ovocito que en la verdadera fisiología del embrión (31).

De esta manera, la evaluación morfológica del embrión en determinados puntos durante su desarrollo parece ser un procedimiento óptimo en la selección de los embriones con mayor potencial de implantación (49).

Por esta razón, cuando se comenzaron a cultivar blastocistos, Gardner y Schoolcraft en 1999 (50) introdujeron un sistema de clasificación de blastocistos que fue rápidamente adoptado por la mayoría de los laboratorios de RA. Aunque el sistema no abarcó todos los aspectos morfológicos del blastocisto, especialmente la morfología aberrante, éste fue muy útil para clasificar al embrión atendiendo a tres características: el grado de expansión del blastocisto, el aspecto morfológico de la MCI y el del TE (23). En sus trabajos, obtuvieron mejores tasas de implantación y de gestaciones a término cuando los blastocistos transferidos presentaron la mejor calificación para las tres características (51, 52, 53). A día de hoy, hay cierta ambigüedad acerca de cuál de las tres características es más o menos determinante a la hora de valorar un blastocisto, aunque desde una perspectiva meramente fisiológica, hay que tener en cuenta que el TE y la MCI no existen de manera aislada, sino que coexisten como una unidad funcional. Por un lado, el TE crea un ambiente único gracias a la formación del blastocelo para la MCI, y por otro, es la propia MCI la que regula la proliferación y la actividad del TE (54, 55). En consecuencia, parecería prudente utilizar ambos parámetros en las decisiones sobre la calidad del embrión (22).

Posteriormente, el consenso de Estambul de 2011 (56), dictó unas directrices de clasificación de blastocistos basadas principalmente en el sistema de Gardner y Schoolcraft con algunas excepciones (23).

En este trabajo se siguieron los criterios de clasificación descritos por ASEBIR (12) que, a diferencia de otras clasificaciones, propone tener en cuenta también la evolución del embrión antes de llegar al estadio de blastocisto. Esta clasificación es muy parecida a la formulada Gardner y Schoolcraft (50), donde se proponen también cuatro calidades (A, B, C y D) y se tuvieron en cuenta las tres características propuestas por ellos.

INTRODUCCIÓN

Una de las ventajas del cultivo largo es la posibilidad de conseguir una sincronización fisiológica óptima del embrión con el endometrio (16, 43). Por otra parte, es fisiológicamente pre-maduro transferir embriones a un útero que ha estado expuesto a concentraciones suprafisiológicas de gonadotropinas, hecho que hace que existan contracciones uterinas aumentando las posibilidades de que los embriones puedan ser expulsados. Estas contracciones uterinas disminuyen significativamente unos días después de la administración de la gonadotropina coriónica humana (hCG), momento en que los blastocistos han tenido tiempo para desarrollarse hasta dicho estadio, minimizando así, las posibilidades de que los embriones puedan ser expulsados (57).

Por tanto, las principales ventajas del cultivo y transferencia de blastocistos implican:

- La sincronización del embrión con el tracto femenino consiguiendo mayores tasas de implantación y, reduciendo así, la necesidad de transferencias múltiples.
- Evaluación de la viabilidad del embrión propiamente dicho antes de la transferencia. El cultivo de blastocisto va más allá de la etapa de 4-8 células, momento en el que comienza la activación del genoma embrionario (17). Es decir, después de la etapa de 8 células lo que evaluamos es el embrión propiamente dicho, mientras que antes, evaluamos la división del ovocito (58). Además se seleccionan únicamente los embriones más viables dentro de la cohorte de embriones que tenemos de ese ciclo.
- Cuando se realiza un DGP, se aumenta el tiempo disponible entre la biopsia de embriones en día +3 y la transferencia en día +5. Esto tiene mayor importancia cuando las células biopsiadas tienen que enviarse a otro lugar para su análisis.
- La posibilidad de biopsiar células del TE para el cribado de enfermedades genéticas (42).

Por el contrario, la mayor preocupación del cultivo de blastocistos radica en las diferencias entre las condiciones de los embriones *in vitro* e *in vivo* que pueden producir que algunos embriones viables puedan detenerse debido a imperfecciones del sistema *in vitro*.

No existe un consenso claro para decidir transferir los embriones en día +3 o llevarlos a cultivo largo y transferirlos en día +5, aunque hay una tendencia lógica a dejarlos a cultivo largo cuando hay un mayor número de embriones en día +3. Por ello, el principal problema que se encuentran los embriólogos ante el cultivo largo es la posibilidad de que no llegue ningún embrión al estadio de blastocisto y se tenga que cancelar la transferencia. En esta circunstancia, que no llegue ningún embrión a blastocisto puede ser un hecho necesario para que, a nivel

INTRODUCCIÓN

personal, algunos pacientes puedan considerar un tratamiento de fertilidad posterior con donación de gametos (59).

El verdadero determinante del potencial de un embrión son los gametos de los que se deriva. Hay un porcentaje significativo de gametos que son cromosómicamente anormales, en el caso de las mujeres aproximadamente el 25% de los ovocitos de un TRA son aneuploides y la frecuencia de esta anomalía, aumenta con la edad materna (60). En el caso de los hombres, no todos los espermatozoides son cromosómicamente competentes. Por tanto, un porcentaje significativo de embriones concebidos mediante ICSI no alcanzarán la etapa de blastocisto, es decir, no van a estar destinados a formar un embrión viable, sino que serán eliminados naturalmente y no llegaran a transferirse. Estos embriones, son aquellos que estaban gravemente anómalos desde un punto de vista genético o que no fueron capaces de activar su genoma embrionario. Sin embargo, esto no garantiza que todos los embriones que llegan blastocisto sean genéticamente normales (26).

Después de la fecundación, el ooplasma se convierte en el citoplasma del embrión, mientras que la participación del espermatozoide hasta el comienzo de la activación del genoma embrionario es mínima. Por esta razón, la calidad de los ovocitos es un factor clave para determinar la calidad de los primeros pasos del desarrollo embrionario (61).

La fertilidad femenina comienza a disminuir muchos años antes del comienzo de la menopausia a pesar de que se tengan ciclos ovulatorios regulares. Por tanto, la edad femenina en sí misma es uno de los factores predictivos más relevantes para la consecución del embarazo (62). Existe una disminución natural de la fertilidad femenina con el aumento de la edad materna y el punto de inflexión parece estar en los 35 años (63).

Una posible explicación a este fenómeno reside en la disminución de la reserva ovárica o el envejecimiento de los ovocitos. La disminución de la reserva ovárica da como resultado una mala respuesta al tratamiento con gonadotropinas y por consiguiente, una disminución en la cantidad y calidad de los ovocitos (64). El envejecimiento ovocitario también se relaciona con el aumento de aneuploidías en los ovocitos y el estrés oxidativo, lo que podría perjudicar la calidad del ovocito y el desarrollo del embrión. La mayor tasa de aneuploidías es una de las principales causas del aumento del aborto espontáneo y la disminución de las tasas de gestaciones evolutivas en las mujeres de edad reproductiva avanzada (65).

Las opciones para tratar la infertilidad relacionada con la edad incluyen la hiperestimulación ovárica controlada y la donación de ovocitos. Cuando el problemas fue

INTRODUCCIÓN

masculino, trompas obstruidas, endometriosis o adherencias pélvicas, el tratamiento más acertado fue la ICSI (66). Sin embargo, la donación de ovocitos es la técnica más eficaz cuando la edad materna es avanzada, sobre todo para las mujeres mayores de 40 años y/o aquellas con una reserva ovárica disminuida.

De manera tradicional, la infertilidad masculina se ha evaluado con un análisis de semen de rutina, en el que se incluye el análisis de la concentración, motilidad y morfología espermática. Sin embargo, los criterios establecidos para la normalidad de dichos parámetros seminales, ofrecen un valor pronóstico limitado en la predicción de los resultados de un TRA (64). Por esta razón, últimamente, el índice de fragmentación del ADN espermático (IFE) también ha ganado un gran valor diagnóstico.

Según algunos estudios (67, 68), la capacidad de la técnica de ICSI para esquivar calidades seminales alteradas tales como, oligozoospermia severa, teratozoospermia o necrozoospermia, hace que, la tasa de fecundación, la división del embrión y la consecución del embarazo sean independientes de los parámetros seminales. Esto es debido a que se selecciona el espermatozoide con mejor motilidad y aspecto morfológico de los que hay disponibles, sea cual sea la calidad seminal. En cambio, otros estudios (69, 70, 71) reportaron que una calidad espermática alterada, conduce a una disminución en la tasa de llegada a blastocisto, mala calidad de los blastocistos formados y altas tasas de aborto.

En consecuencia, la ICSI ha sido reconocida como una técnica muy eficiente para solventar los casos de infertilidad masculina. La selección del espermatozoide que se va a utilizar para la ICSI es responsabilidad del embriólogo, que elige uno móvil y con el mejor aspecto morfológico posible. Indudablemente, una morfología espermática normal se asocia a una buena calidad embrionaria (69), aunque, los espermatozoides seleccionados mediante la ICSI pueden tener ADN dañado (72).

El origen del daño en el ADN espermático pudo tener lugar durante la espermatogénesis. Durante la maduración de los espermatozoides hay una sustitución de histonas por protaminas para aumentar el grado de empaquetamiento de la cromatina, consiguiendo así, una condensación al menos seis veces superior que en los cromosomas mitóticos. Las protaminas son proteínas de aproximadamente la mitad del tamaño de una histona típica (5 ± 8 kDa) (73).

Ahora bien, el daño en el ADN espermático puede ocurrir en el momento de su empaquetamiento, es decir, durante la espermatogénesis (debido al estrés ambiental,

INTRODUCCIÓN

mutaciones genéticas y/o anormalidades cromosómicas) o como resultado de dicho empaquetamiento. Alternativamente, podría resultar del daño producido por radicales libres o como consecuencia de la apoptosis (74).

Cuando las especies reactivas de oxígeno (ROS) están en niveles altos, son potencialmente tóxicos para los espermatozoides. Los ROS son agentes oxidantes altamente reactivos, entre los que se incluyen peróxido de hidrógeno, superóxido y radicales libres. Los factores que protegen al ADN espermático de este tipo de estrés son la supercompactación del ADN y los antioxidantes presentes en el plasma seminal (73).

En cambio, la apoptosis es un modo de muerte celular programada basada en un mecanismo que induce una serie de alteraciones celulares, morfológicas y bioquímicas, llevando a la célula al suicidio. En los testículos de mamíferos, las células germinales antes convertirse en espermatozoides maduros, se dividen clonalmente a través de rondas de mitosis. Esta expansión clonal es excesiva (sobre todo porque se necesita un único espermatozoide por óvulo) y por tanto, necesita un mecanismo como la apoptosis para que coincida el número de células germinales con la capacidad de soporte de las células de Sertoli. De ahí que, la apoptosis controle la sobreproducción de los gametos masculinos (73).

Sin lugar a dudas, la ICSI ha revolucionado la infertilidad masculina severa aunque ha aumentado también la probabilidad de seleccionar un espermatozoide con un genoma anormal para fecundar el ovocito y, teóricamente, sólo aquellos embriones con un genoma intacto podrían convertirse en blastocistos. Actualmente hay evidencias de que los espermatozoides con el ADN fragmentado pueden estar vivos, ser morfológicamente normales y capaces de fecundar al ovocito (75).

Por tanto, el daño en el ADN espermático es una causa de infertilidad masculina importante y tiene un gran valor diagnóstico y pronóstico en comparación con otros parámetros seminales de rutina. No obstante, se pueden tener unos parámetros seminales normales con un IFE alterado (72, 75). Cuando se estudia el IFE se considera una muestra de semen fértil si la proporción máxima de células con daño en el ADN no excede aproximadamente del 27% (76).

Varios autores han reportado una correlación negativa entre los altos niveles de fragmentación del ADN espermático (IFE) y los resultados en los TRA (74, 77, 78, 79, 80, 81), observándose una disminución en la tasa de fecundación, la calidad embrionaria y un mayor tiempo para que el embrión alcance la etapa de blastocisto (82). Aunque la verdadera

INTRODUCCIÓN

importancia clínica del daño en el ADN espermático aún no se ha establecido por completo ya que los estudios disponibles son muy heterogéneos (83).

Ahora bien, hay evidencia de que el ovocito es capaz de reparar el daño en el ADN del espermatozoide, aunque esta reparación está asociada con el tipo de daño (de cadena simple o doble) y con la calidad del ovocito para que pueda llevarlo a cabo (74). Dentro del óvulo fecundado, el daño del ADN espermático puede ser reparado durante el período comprendido entre la entrada de espermatozoides en el citoplasma y el comienzo de la siguiente fase S (73). Este fenómeno se debe a que los espermatozoides tienen pocos mecanismos de reparación y sólo los ovocitos, pueden reparar en cierta medida dicho daño espermático. Los espermatozoides con el ADN dañado no impiden la fecundación y la formación de pronúcleos, incorporando el ADN dañado al genoma embrionario (84). Durante la embriogénesis, este daño puede conducir a errores en la replicación, transcripción y traducción del ADN (75, 85). Por consiguiente, en los ovocitos y embriones, la reparación del ADN espermático es probablemente uno de los procesos más importantes que se deben realizar tras la fecundación, para permitir un desarrollo embrionario completo (86).

En resumen, la cromatina espermática es una estructura muy compleja y, su capacidad para descondensarse es uno de los criterios esenciales para considerar un espermatozoide fértil. En consecuencia, la integridad del ADN en los espermatozoides es esencial para la transmisión precisa de la información genética (73).

Con lo cual, con todo lo mencionado anteriormente, creemos que sería una buena oportunidad evaluar cuales son los factores que influyen de un modo más determinante en el cultivo largo a blastocisto en nuestro centro y analizar los resultados obtenidos. Por todo ello, durante el desarrollo de este trabajo nos planteamos las posibles repercusiones que tiene el origen de los ovocitos (ovocitos propios o donados), la calidad seminal y el IFE en el desarrollo a blastocisto y la consecución del embarazo. Así como, valorar si las calidades embrionarias propuestas en día +3 pudieron pronosticar las calidades en día +5, además de analizar, qué pacientes se vieron beneficiados del cultivo largo.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El principal objetivo de la FIV es conseguir un recién nacido sano en casa. Para que este proceso mejore, se requiere una buena selección embrionaria aunque, cabe esperar que el verdadero determinante del potencial de un embrión sean los gametos de los que se deriva.

El ovocito humano se fecunda en las trompas de Falopio y se va desarrollando durante su transporte hacia el útero donde se implantará en fase de blastocisto. La evaluación de embriones en este estadio de desarrollo es la forma más adecuada para estudiar cómo influye el factor femenino y masculino en el embrión, ya que, el genoma embrionario empieza a funcionar a partir de día +3, pudiendo de esta manera, evaluar el embrión propiamente dicho, mientras que hasta día +3, principalmente es competencia del ovocito. Por tanto, cabe esperar que sea el ovocito el que tuviera un mayor impacto sobre el embrión. Aún así, es importante destacar también que, los espermatozoides con altos niveles de ADN fragmentado se correlacionan con una disminución de la tasa de fecundación y llegada a blastocisto, aunque el ovocito es capaz de reparar en cierta medida este daño espermático. Por tanto, la calidad del material genético de los espermatozoides también podría convertirse en un factor pronóstico.

El objetivo general del presente trabajo fue estudiar cómo influye el factor femenino y masculino en el en el desarrollo embrionario hasta blastocisto y cómo de determinantes fueron en la consecución del embarazo. Teniendo en cuenta que el cultivo largo nos proporciona por un lado, una información adicional que mejora la selección de los embriones a transferir aumentando así, la tasa de gestación evolutiva y, por otro lado, transferir blastocistos consigue una mejor sincronía endometrial, en el presente trabajo también se profundizó en los mecanismos implicados en dichos efectos.

1.1. OBJETIVOS

Para ello, mediante un estudio prospectivo no randomizado y, utilizado ciclos de ICSI con cultivo largo, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Evaluar el factor ovocitario y ver cómo influye la edad materna en el desarrollo de los embriones desde día +1 hasta día +5 o +6, así como, en la consecución del embarazo.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. Evaluar el factor masculino y ver cómo se relaciona la calidad seminal en el desarrollo de los embriones desde día +1 hasta día +5 o +6, así como, en la consecución del embarazo.
3. Estudiar y analizar el efecto de la fragmentación del ADN espermático (IFE) en el desarrollo del embrión y la capacidad del ovocito para reparar este daño espermático.
4. Evaluar si las calidades embrionarias propuestas en día +3 de desarrollo pueden pronosticar las calidades en día +5.
5. Evaluar qué tipo de pacientes se ven beneficiados al realizar cultivo largo.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1.1. EQUIPOS Y MATERIALES UTILIZADOS

El estudio se realizó en la clínica Ginefiv S.L. ubicada en Madrid, utilizando las siguientes infraestructuras y recursos materiales:

EQUIPOS UTILIZADOS EN LA CONSULTA DE GINECOLOGÍA

- Ecógrafo TOSHIBA SSA-530 (TOSHIBA Medical Systems S.A., Madrid) con sonda transvaginal y abdominal. Se utilizó para el control ecográfico del ciclo de las pacientes y, para el seguimiento del embarazo durante las primeras semanas.

EQUIPOS UTILIZADOS EN LA ZONA DE QUIRÓFANO

- Ecógrafo TOSHIBA SSA-530 (TOSHIBA Corp., Japón) con sonda transvaginal y abdominal acoplado a una bomba de vacío (LABOTECT 4014, Gmbh Labor-Technik, Göttingen, Alemania) con una aguja de punción 7G (LABOTECT Gmbh Labor-Technik, Göttingen, Alemania). Se utilizó para realizar las punciones ováricas y/o transferencias embrionarias.
- Ecógrafo ALOKA SSD-1700 (HITACHI Medical Systems Europe Holding AG, Suiza) acoplado a sonda abdominal. Se utilizó para hacer transferencias embrionarias.
- Estación de anestesia FABIUS TIRO (DRÄGUER Medical Hispania S.A., Madrid). Se utilizó para la monitorización anestésica de las pacientes durante la punción ovárica.
- Superficie calefactada (Hot Plate 062, LABOTECT Gmbh Labor-Technik, Göttingen, Alemania). Utilizada en quirófano para mantener los tubos con los líquidos foliculares a 37°C antes de pasarlos al laboratorio de FIV.
- Autoclave STURDY SA-230 FA (STURDY Industrial Steam Co., Ltd. Taiwán). Se utilizó para autoclavar todo el instrumental de acero inoxidable del laboratorio y quirófano.

EQUIPOS UTILIZADOS EN EL LABORATORIO DE FIV

- Cuatro campanas flujo laminar con superficie calefactada y sistema de CO₂ (K-SYSTEMS Kivex Biotec. Ltd., Noruega) acopladas a un microscopio estereoscópico Nikon (Nikon Corp., Japón). Esta zona fue destinada a la manipulación de gametos, embriones y preparación de las placas de cultivo.
- Cinco incubadoras G185 *Long term flat bed* (K-SYSTEMS Kivex Biotec Ltd., Noruega). Se destinaron a la incubación de ovocitos y cultivo de embriones hasta el estadio de blastocisto. El propio incubador lleva integrado un mezclador de CO₂ y N₂ con un suministro conectado de dichos gases.
- Tres microscopios invertidos Nikon TE 2000S y Nikon Eclipse Ti (NIKON Corp., Japón) con superficie calefactada (Tokai *Hit Thermo Plate*, OLYMPUS Corp., Japón) acoplados a microinyectores Narishige (NARISHIGE Corp., Japón), donde se realizó la selección de espermatozoides e ICSI.
- Microscopio invertido DIAPHOT 200 (NIKON Corp., Japón) con superficie calefactada (Tokai *Hit Thermo Plate*, OLYMPUS Corp., Japón). Se utilizó para la valoración morfológica de óvulos y embriones.
- Pipetas automáticas de distinto calibrado (GILSON, Francia; EPPENDORF, Alemania).
- Controladores de temperatura y concentración de CO₂ (LABOTECT GmbH Labor-Technik, Göttingen, Alemania). Se utilizaron para realizar el control diario de las temperaturas y CO₂ de las incubadoras.
- Torres con filtros CODA (GEN X International, América) para la filtración de posibles compuestos volátiles en el área del laboratorio de FIV.
- Banco de vapores de nitrógeno líquido CBS V1500-AB *Isothermal Freezer* (CUSTOM BIOGENIC SYSTEMS®, MI, U.S.A.). Donde se almacenaron todos los embriones criopreservados.

EQUIPOS UTILIZADOS EN EL LABORATORIO DE ANDROLOGÍA

- Superficies calefactadas *Hot Plate 062* (LABOTECT GmbH Labor-Technik, Göttingen, Alemania). Se utilizaron para mantener las muestras espermáticas 37°C.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Dos campanas de flujo laminar horizontal TELSTAR V-100 (TELSTAR Grupo, Barcelona) con microscopio invertido NIKON TMS-F (NIKON Corp., Japón). En esta zona se realizó la valoración espermática y el procesado de muestras seminales.
- Tres centrifugas KUBOTA 2420 (KUBOTA Corp., Japón). Se utilizaron para la capacitación y lavado de las muestras espermáticas.
- Banco de N₂ líquido ARPEGE 170 (AIR LIQUIDE Medicinal S.L., Madrid). Donde se almacenaron las muestras criopreservadas de los pacientes y donantes de semen.
- Microscopio de campo claro LEICA DMS 750 (LEICA Microsystems, Alemania). Se utilizó para la visualización de la morfología espermática.
- Contador de células LEUCOFORM (CRISON Instruments, S.A., Barcelona). Se usó para el recuento de espermatozoides durante el contaje de la morfología espermática.
- Nevera THERMOLABIL (LIEBHERR, Alemania) para el mantenimiento de medios de cultivo y crioprotectores.
- Pipetas automáticas de distinto calibrado (GILSON, Francia; EPPENDORF, Alemania).

Por último, se contó con un programa informático gestionado por Ginefiv, donde quedó registrada toda la información relacionada con cada paciente. Este sistema se utilizó para reportar todos los datos de las historias clínicas incluidas en el diseño de este trabajo.

1.2. SELECCIÓN DE PACIENTES

Los datos analizados en este trabajo correspondieron a un estudio realizado en la clínica Ginefiv S.L, de forma prospectiva y no randomizada, entre el 1 de enero de 2012 y el 31 de septiembre de 2015.

Se incluyeron 662 pacientes que llevaron sus embriones a día +5 o +6 de cultivo embrionario (cultivo largo) generando 2898 embriones en estado de blastocisto que, o bien se transfirieron ese mismo ciclo, o bien se vitrificaron para futuros tratamientos.

Se incluyeron tanto los ciclos con ovocitos propios y donados, como los ciclos con semen homólogo y heterólogo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los pacientes que llevaron sus embriones a cultivo largo fueron aquellos que:

- Tuvieron ciclos previos con fallos de implantación. Con el cultivo largo se pudo observar el desarrollo embrionario hasta día +5 o +6 y, de esta manera, comprobar que el embrión no se bloqueó durante los primeros días de desarrollo y fue capaz de llegar a blastocisto.
- Pacientes en las que se deben evitar las gestaciones múltiples (patologías ginecológicas que lo impidan) transfiriendo un único embrión. Se considera que un embrión en este estadio tiene mayor tasa de implantación que un embrión en día +3 de desarrollo.
- Pacientes del programa de DGP. La biopsia embrionaria se realiza en día +3 y el embrión permanece en el laboratorio hasta día +5, día que se conoce el resultado del análisis.
- Pacientes que tienen un número elevado de embriones en día +3 de desarrollo. No todos los embriones van a ser capaces de llegar a este estadio, por tanto, solo contaremos con aquellos que sí llegaron, mejorando la selección y, reduciendo así, el número de embriones que se deben criopreservar.

A lo largo de este trabajo se quiere dejar constancia que, se referirá a “preembrion” siempre que se use el término “embrión” de acuerdo con la ley 14/2006 de 26 de Mayo, sobre técnicas de reproducción asistida que, lo define como “el embrión *in vitro* constituido por el grupo de células resultantes de la división progresiva del ovocito desde que es fecundado hasta 14 días más tarde”.

PACIENTES CON OVOCITOS PROPIOS

La fecundación *in vitro* con ICSI en este grupo de estudio, estuvo indicada cuando la paciente presentó patología tubárica, endometriosis, fallo de inseminación artificial, factor masculino, esterilidad de origen desconocido, fallo ovárico y/o disminución de la reserva ovárica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para ello, las pacientes tuvieron que someterse a una estimulación ovárica cuyo objetivo fue:

- Obtener una respuesta suprafisiológica, aumentando así el número de ovocitos y embriones disponibles para seleccionar el día de la transferencia, favoreciendo en definitiva, las tasas de embarazo.
- Evitar picos espontáneos y prematuros de hormona luteinizante (LH).
- Disminuir las complicaciones derivadas de estos procedimientos.

Según los protocolos establecidos por Ginefiv las pacientes se clasificaron en:

- Altas respondedoras: pacientes menores de 30 años, con un recuento de folículos antrales (RFA) mayor de 15 folículos en ecografía basal, criterios de ovarios poliquísticos (PCOS) según los Criterios Internacionales de Rotterdam, hormona antimulleriana (AMH) mayor de 3 ng/ml y/o antecedentes de síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) en ciclos previos.
- Normo respondedoras: pacientes menores de 38 años, con un RFA menor de 12 folículos en ecografía basal, AMH entre 1,2 y 3 ng/ml, hormona folículo estimulante (FSH) menor de 10 UI/l, índice de masa corporal (IMC) no extremo ($<35 \text{ kg/m}^2$), sin diagnóstico de PCOS y sin respuesta anómala previa.
- Bajas respondedoras: pacientes que según los criterios internacionales del Consenso de Bologna 2011 (87), cumplieron al menos dos de las siguientes tres características:
 - Edad materna avanzada (≥ 40 años).
 - Baja respuesta en ciclos previos (≤ 3 ovocitos con un protocolo de estimulación convencional).
 - Reserva ovárica anormal:
 - RFA $< 5-7$ folículos en ecografía basal.
 - AMH $< 0.5-1.1$ ng/ml.

Todas las pacientes, además de haber sido sometidas a una estimulación ovárica controlada, también se sometieron a una preparación endometrial mediante la administración de gonadotropinas.

Estimulación ovárica

Durante la estimulación ovárica se emplearon hormonas liberadoras de la LH y FSH para conseguir un reclutamiento folicular múltiple y por consiguiente, un mayor número de ovocitos maduros durante la punción ovárica.

➤ Altas respondedoras

Este grupo de pacientes siguieron, o bien una pauta con antagonistas, o bien, con agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) para su estimulación ovárica.

Pauta con antagonistas de la GnRH

Fue la primera opción utilizada como protocolo de estimulación ovárica a la hora de realizar un ciclo de FIV.

Se realizó una ecografía basal entre el primer y segundo día del ciclo para verificar que los ovarios estuvieran en reposo. Una vez verificado, la paciente se administró gonadotropinas subcutáneas en dosis de 100-150 UI de PUREGON® o GONAL® (FSH recombinante (FSHr)) durante los primeros cinco días del ciclo. Al sexto día, se realizó una ecografía y, si se observaron folículos con más de 13-14 mm de tamaño, se empezó con un antagonista de tipo ORGALUTRAN® (0,25 mg/día) o CETROTIDE® (0,25 mg/día, vía subcutánea) para evitar un crecimiento folicular asincrónico y prevenir los picos prematuros de LH.

Se realizaron ecografías controles cada 48-72 horas. Una vez que se alcanzaron los criterios ecográficos de 3 o más folículos mayores de 17 mm, se indujo la ovulación con gonadotropina coriónica humana (hCG) OVITRELLE® (250 mg, pluma precargada).

Sí se vio que la paciente podía cumplir los criterios de SHO, tales como: más de 15 folículos puncionables mayores de 13-14 mm, estradiol basal por encima de 3500 UI, distensión abdominal, sobrepeso, dolor pélvico y/o líquido libre en ecografía, se indujo la ovulación con un análogo de la GnRH denominado DECAPEPTYL® (0,2 mg dosis única). En estos casos, se canceló la transferencia embrionaria en ese ciclo y se criopreservaron todos los embriones viables, puesto que el DECAPEPTYL®, hace que el endometrio sea no apto para la transferencia embrionaria inmediata.

36 horas después de la inducción de la ovulación, se realizó la punción ovárica ecoguiada bajo sedación inconsciente.

Pauta con agonistas de la GnRH

Fue la segunda opción elegida como protocolo para estimular a este grupo de pacientes. La estimulación consistió en la administración de análogos (agonistas) de la GnRH como DECAPEPTYL®, PROCRIN® (0,1 mg diario a partir del día 20-21 del ciclo previo al mes que empezó la estimulación) o SYNAREL® (3 inhalaciones a partir de día 21 del ciclo previo; una vez se ha conseguido el frenado hipofisario se bajó a 2 inhalaciones cada 24 horas). Cuando la paciente estuvo con la menstruación, se empezó con la administración de gonadotropinas de tipo PUREGON® o GONAL® (FSHr) a dosis de 100-150 UI y, desde el 3º día, la dosis del agonista (DECAPEPTYL®, PROCRIN® o SYNAREL®) se bajó a la mitad y se mantuvo hasta el día de la administración del OVITRELLE®.

Una vez alcanzados los criterios ecográficos de 2 o más folículos mayores de 18 mm, se indujo la ovulación con OVITRELLE® (250 mg, pluma precargada). Tras 36 horas, se realizó la punción ovárica ecoguiada bajo sedación inconsciente.

➤ Normo respondedoras

Igualmente, estas pacientes pudieron seguir una pauta con antagonistas o con agonistas de la GnRH para su estimulación ovárica.

Pauta con antagonistas de la GnRH

En este grupo de pacientes también fue la primera opción elegida como protocolo de estimulación ovárica.

Las pacientes se realizaron una ecografía basal entre el primer y segundo día del ciclo, y se comprobó que los ovarios estuvieran en reposo. Cuando se verificó este requisito, la paciente empezó la administración de gonadotropinas de tipo PUREGON® o GONAL® (ambas FSHr) en dosis de 225 UI durante los primeros cinco primeros días del ciclo. Al sexto día, se realizó una ecografía para comprobar el reclutamiento folicular.

Se introdujeron antagonistas de la GnRH de tipo ORGALUTRAN® o CETROTIDE® el sexto día de estimulación cuando el estradiol fue mayor de 400-500 UI o, si hubo folículos de 13-14 mm antes del 6º día de estimulación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron ecografías controles cada 48-72 horas. Una vez se visualizaron tres o más folículos mayores de 17 mm, se indujo la ovulación con OVITRELLE® (250 mg, pluma precargada) y, tras 34-36 h se realizó la punción ovárica bajo sedación inconsciente.

Pauta con agonistas de la GnRH

Cuando esta opción fue elegida, las pacientes pudieron realizarse una pauta larga o corta de estimulación ovárica.

La pauta larga consistió en la administración de análogos (agonistas) de la GnRH tipo DECAPEPTYL®, PROCRIN® 2,8 mg (0,1 mg diario a partir del día 20-21 del ciclo previo al mes que empezó la estimulación para conseguir un frenado hipofisario al iniciar la estimulación) o SYNAREL® (3 inhalaciones a partir de día 21 del ciclo; una vez conseguido el frenado hipofisario se bajó a 2 inhalaciones cada 24 h). Cuando la paciente estuvo con la menstruación, se empezó la estimulación con gonadotropinas de tipo PUREGON® o GONAL® a dosis de 225 UI y, desde el tercer día, la dosis del agonista se bajó a la mitad y se mantuvo hasta el día de la administración del OVITRELLE®.

Cuando se visualizaron dos o más folículos mayores de 18 mm, se indujo la ovulación con OVITRELLE® (250 mg, pluma precargada) y, tras 34-36 h, se realizó la punción ovárica ecoguiada bajo sedación inconsciente.

Si por el contrario, se eligió una pauta corta, se aprovechó el efecto *flare-up* del uso de los agonistas desde el inicio de la estimulación ovárica con FSHr, de esta manera se aprovechó la liberación endógena de las gonadotropinas y se logró un mayor reclutamiento folicular.

➤ **Bajas respondedoras**

En este grupo de pacientes, el día de la punción ovárica se realizó una ecografía previa con el fin de descartar un pico ovulatorio precoz y la punción se hizo de forma manual con lavado folicular, optimizando así el número de ovocitos obtenidos.

Este protocolo de estimulación también se pudo realizar mediante una pauta con antagonistas o agonistas de la GnRH.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pauta con antagonistas de la GnRh

Fue la primera opción utilizada en este tipo de pacientes. La estimulación comenzó con la verificación ecográfica de los ovarios en reposo durante la menstruación. Una vez comprobado, se administraron gonadotropinas de forma combinada (FSH + LH) en dosis altas de 300-375 UI de PUREGON® o GONAL® (FSHr) y MENOPUR® o LUVERIS® (LH) durante los cinco primeros días del ciclo y se fue ajustando la dosis según la respuesta observada.

Se realizó una ecografía al sexto día de estimulación para comprobar el reclutamiento folicular. Con folículos mayores de 13-14 mm se empezó con el antagonista de tipo ORGALUTRAN® (0,25 mg/día) o CETROTIDE (0,25 mg/día) evitando la asincronía folicular.

Se realizaron ecografías controles cada 48-72 horas. Cuando se visualizaron tres o más folículos mayores de 17 mm, se indujo la ovulación con OVITRELLE® (250 mg, pluma precargada) y, tras 32 horas, se realizó la punción ovárica ecoguiada bajo sedación inconsciente.

Pauta con agonistas de la GnRH

Durante la estimulación con agonistas de la GnRH se utilizó una pauta corta para aprovechar el efecto *flare-up* de los agonistas desde el segundo día de menstruación.

La estimulación solo comenzó cuando los ovarios estuvieron en reposo y, posteriormente, se administraron las gonadotropinas de forma combinada (FSH + LH) en dosis altas de 300-375 UI de PUREGON® o GONAL® (FSHr) y MENOPUR® o LUVERIS® (LH) los cinco primeros días del ciclo, ajustándose la dosis según la respuesta.

Se les realizó ecografías controles cada 48-72 horas. Al visualizarse tres o más folículos mayores de 17 mm, se indujo la ovulación con la hCG OVITRELLE® (250 µg) y, tras 32 h, se realizó la punción ovárica bajo sedación inconsciente.

Preparación del endometrio

Paralelamente hubo que preparar también el endometrio ya que, la transferencia embrionaria fue el último paso de la FIV. La implantación está controlada por el diálogo entre el embrión y el endometrio, por tanto, debe empezar a prepararse en las primeras etapas de la maduración del ovocito.

MATERIAL Y MÉTODOS

La transferencia embrionaria se realizó cinco días después de la punción y el objetivo de la preparación del endometrio fue hacerlo receptivo para la implantación del embrión/es.

Para conseguir dicho objetivo, se administró progesterona micronizada (PROGEFFIK®) desde de la noche de la punción ovárica en dosis de 200 mg vía vaginal cada 8 h, manteniendo la dosis hasta la prueba de embarazo.

PACIENTES CON RECEPCIÓN DE OVOCITOS

Este grupo de pacientes comprende aquellas que usaron ovocitos de una donante para la realización del ciclo de FIV.

Las principales indicaciones para ser receptoras de óvulos fueron: menopausia, fallo ovárico precoz, fallo ovárico por quimioterapia o radioterapia, ser portadoras de alteraciones genéticas o tener disgenesias gonadales, haber sufrido fallos repetidos de FIV por causa ovocitaria, factor etario o baja respuesta y/o ovarios inaccesibles.

Selección de donantes de ovocitos

La selección y aceptación de donantes de óvulos en nuestro centro se realizó siguiendo el marco jurídico regulador de la reproducción asistida en España, que está constituido actualmente por la Ley 14/2006 del 26 de Mayo.

Las donantes de óvulos fueron elegidas con una edad comprendida entre los 18 y 35 años, con plena capacidad de obrar, buen estado psicofísico y sin antecedentes personales o familiares de enfermedades hereditarias. Además, debieron tener un cariotipo normal y serologías negativas para sífilis, HBV, HCB, HIV, gonorrea y clamidias antes de iniciarse la estimulación. Se respetó no tener más de 6 hijos nacidos en España con una misma donante.

La asignación donante-receptora se realizó manteniendo la máxima similitud fenotípica e inmunológica posible con la madre receptora de los gametos.

Estimulación ovárica donantes de ovocitos

El objetivo de los protocolos de estimulación en las donantes de óvulos fue: alcanzar un reclutamiento y desarrollo folicular múltiple mediante la estimulación con gonadotropinas y, prever los picos prematuros de LH.

A las donantes de ovocitos se las estimuló mediante un ciclo corto con antagonistas de la GnRH y un anticonceptivo oral (ACO) previo durante al menos 14 días. La medicación usada fue PUREGON® o GONAL® (FSHr) a dosis moderadas entre 100-225 UI. Cuando por ecografía se visualizaron al menos tres folículos superiores a 20 mm, se administró DECAPEPTYL® (0,2 ml dosis única), análogo de la GnRH y, tras 36 h, se llevó a cabo la punción ovárica ecoguiada bajo sedación inconsciente.

➤ Preparación endometrial en receptoras

Como ya hemos comentado anteriormente, la preparación endometrial es muy importante ya que, la calidad, grosor y aspecto del endometrio tienen que ser adecuados para la implantación del embrión.

A las receptoras de ovocitos se les realizó una supresión hipofisaria previa y un ciclo sustitutivo, de tal manera que:

- La supresión hipofisaria se consiguió en la fase lútea del ciclo previo, mediante ACO en pauta continua como YASMIN®, EDELSIN® o un análogo de la GnRH de tipo DECAPEPTYL® desde el día 21 del ciclo. En los casos en los que la paciente estuvo en amenorrea al inicio del tratamiento, se realizó directamente la preparación endometrial sin dicha supresión.
- En el ciclo sustituido se administraron estrógenos como PROGYNOVA® o MERIESTRA® vía oral a dosis entre 4-8 mg/día o bien, mediante ESTRADERM MX® vía transdérmica a dosis de 50-150 mg/3 días, con el fin de conseguir un endometrio trilaminar o proliferativo con un grosor superior a 7 mm y ser óptimo para la transferencia embrionaria.

Además, la noche anterior a la punción ovárica de la donante, la receptora comenzó con la suplementación de progesterona micronizada (PROGEFFIK® o UTROGESTÁN® vía oral o vaginal) con una dosis de 800 mg/día hasta el día de la prueba de embarazo.

PACIENTES CON SEMEN HOMÓLOGO

En este grupo se incluyeron aquellos pacientes que usaron su muestra seminal para llevar a cabo la ICSI de los ovocitos.

Estos pacientes tuvieron que realizarse al menos un seminograma previo en nuestro centro al inicio del TRA.

La valoración y el procesamiento de la muestra se hizo siempre en una cabina de flujo laminar horizontal y a temperatura ambiente.

Seminograma previo

El seminograma consiste en el análisis o valoración del eyaculado. Se trata de la primera prueba diagnóstica que se realiza al varón cuando va a someterse a algún TRA. Ésta prueba constituye una herramienta básica para la detección de posibles patologías clínicas o alteraciones en la calidad seminal que puedan estar generando alguna dificultad para obtener el embarazo.

En un seminograma, se analizan tanto características macroscópicas como microscópicas, cuyo resultado será comparado con los valores de referencia establecidos en el Manual para el análisis de semen de la Organización Mundial de la Salud (OMS) actualizado en 2010 (88).

Las muestras seminales se obtuvieron por masturbación en un bote de orina estéril, con una abstinencia sexual entre 2 y 6 días. Se procesaron en un periodo máximo de una hora, manteniéndolas siempre a 37° C sobre una superficie calefactada. Tras la licuefacción, se diagnosticaron macro y microscópicamente los distintos parámetros seminales.

En el estudio macroscópico se valoró el volumen de la muestra, ayudándonos de jeringas graduadas de 10 ml y, la medición del pH, mediante tiras reactivas pH Merck (MERCK, Darmstadt, Alemania) con límites de sensibilidad de 6,5 a 10,0.

El estudio microscópico comprende el análisis de distintos parámetros seminales tales como la concentración, motilidad o morfología espermática:

- La concentración espermática se determinó valorando 15 µl de la muestra sobre una cámara Makler® (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) visualizada bajo el microscopio

MATERIAL Y MÉTODOS

invertido con el objetivo de 10 aumentos. Esta cámara consta de una cuadrícula de 1 mm² dividida en 100 cuadros con una profundidad de 10 µm. Los espermatozoides contados en 10 cuadros determinaron la concentración en millones por mililitro (imagen 1).

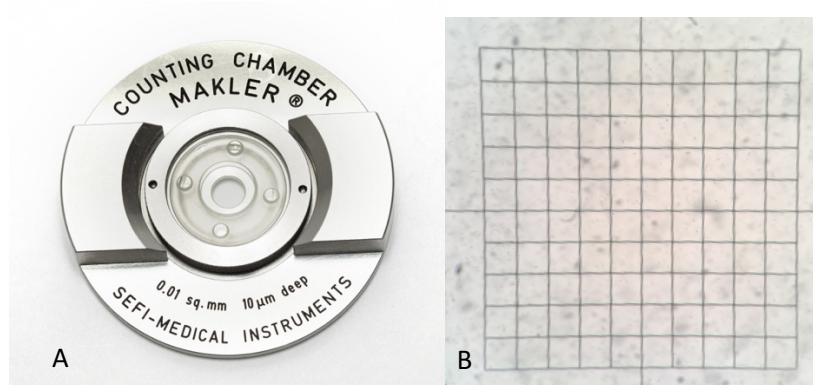


Imagen 1: A) Cámara Makler®. B) Cuadrícula de la cámara Makler® vista a 10x. Para hallar la concentración por ml se cuentan los espermatozoides que hay en los 10 cuadrados de 2 diagonales y se calcula su media.

- La motilidad espermática se determina con 15 µl de muestra sobre un portaobjetos cubriendo la microgota con un cubreobjetos de 24x24 mm. Mediante el microscopio de contraste de fase y, con el objetivo de 40 aumentos, se valoró además de la motilidad, la presencia o no de aglutinaciones espermáticas, de leucocitos y de otras células no espermáticas, como por ejemplo, las células de descamación. Siguiendo las recomendaciones de la OMS 2010 (88) se distinguieron tres categorías según el movimiento y velocidad espermática:
 - Tipo progresivo (PR): espermatozoides con movimiento progresivo.
 - Tipo no progresivo (NPR): espermatozoides con movimientos sobre sí mismos, es decir, movimientos *in situ* o circulares sin desplazamientos.
 - Tipo inmóvil: espermatozoides parados que no mostraron ningún tipo de movimiento.
- La morfología espermática define la forma que tienen los espermatozoides y se visualiza a través de una extensión de 5-15 µl de muestra dispuesta sobre un portaobjetos. Para poder visualizarla se tuvo que teñir siguiendo el protocolo de tinción de Wright con

MATERIAL Y MÉTODOS

reactivos PANREAC APPLICHEM (Panreac Química S.L.U.). Para ello, tras 20 minutos en la solución fijadora PANOPTIC Nº 1, se dejó secar y se pasó por PANOPTIC Nº 2 (eosina) durante 5 minutos y finalmente, por PANOPTIC Nº 3 (azur B o azul de metileno) durante 2 minutos. El proceso terminó aclarando con agua destilada y dejando secar el portaobjetos. La morfología se valoró en 100 espermatozoides, con el objetivo de 100 aumentos previamente cubierto con aceite de inmersión. En el recuento solamente se tuvieron en cuenta las células reconocidas como espermatozoides. Se consideró un espermatozoide morfológicamente normal cuando el tamaño y forma de su cabeza, el cuello y la pieza intermedia y su cola, se establecieron dentro los valores de referencia marcados por la OMS 2010 (88) donde:

- Una cabeza normal tuvo que medir entre 3,7-4,7 μm de largo y 2,5-3,5 μm de ancho, ser lisa, sin irregularidades y con forma oval. Tuvo que presentar un acrosoma bien definido que ocupara entre el 40-70% del área de la cabeza y sin vacuolas que ocuparan más del 20% (imagen 2). La morfología anormal de la cabeza fue característica de cabezas cónicas, piramidales, globulares, amorfas, vacuoladas y/o con acrosomas pequeños (imagen 3 y 4).
- La pieza intermedia o cuello, de aproximadamente de 1 μm de ancho, debía encontrarse bien unido a la cabeza y medir menos de la tercera parte de ésta. Los cuellos doblados, mal insertados, demasiado gruesos o finos fueron considerados anormales (imagen 3 y 4).
- La cola fue siempre más fina que el cuello y tuvo que medir unos 45 μm de largo sin encontrarse angulada o enrollada.

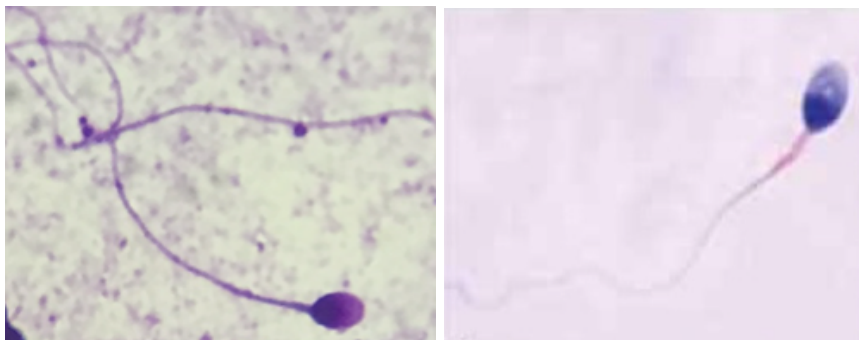


Imagen 2: Espermatozoides morfológicamente normales.

MATERIAL Y MÉTODOS

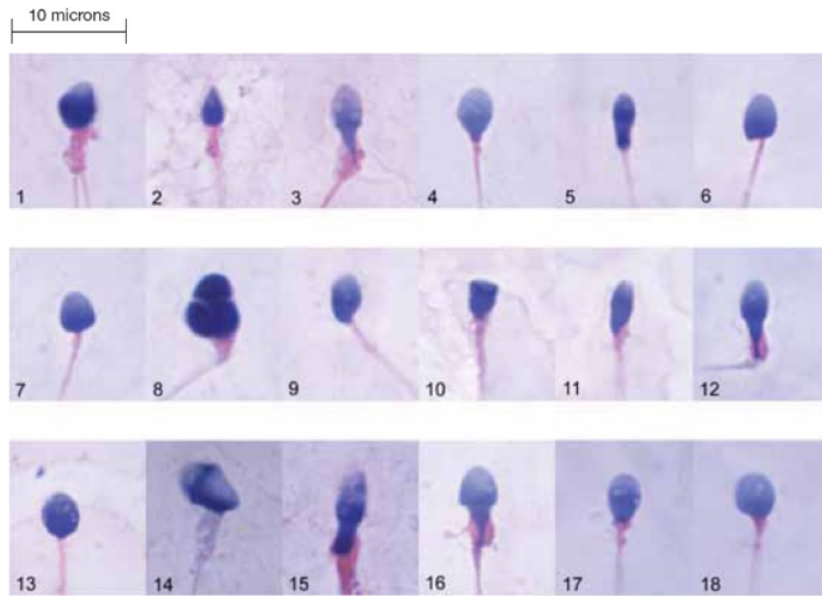


Imagen 3: Espermatozoides morfológicamente anormales. Todos tienen alteraciones en la cabeza, pieza intermedia y/o cola.

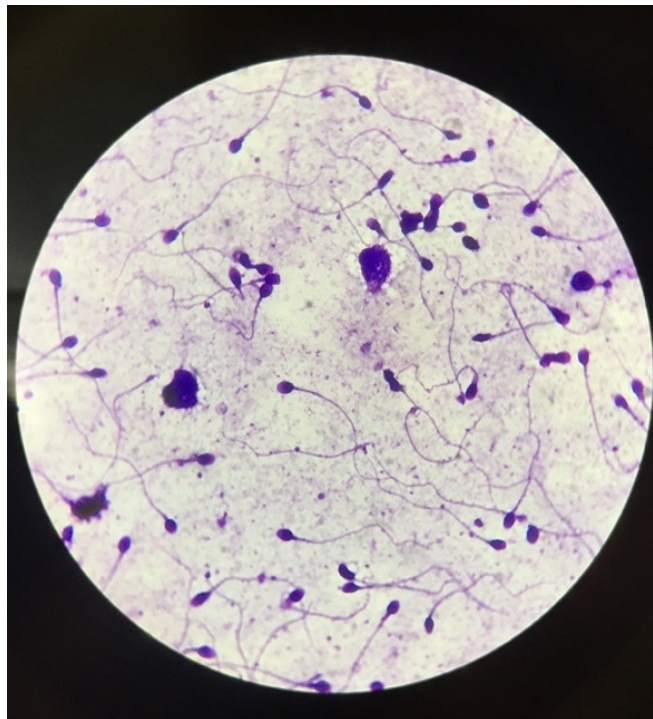


Imagen 4: Campo de una extensión teñida. Se pueden visualizar espermatozoides normales y anómalos. Se calcula el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y anormales para determinar la morfología.

MATERIAL Y MÉTODOS

Por tanto, para considerar una muestra normal o normozoospermica se tuvo que cumplir:

- Volumen $\geq 1,5$ ml.
- pH $> 7,2$.
- Concentración espermática ≥ 15 millones/ml y ≥ 39 millones en el total del eyaculado.
- Al menos un 32% de los espermatozoides con velocidad de tipo PR.
- $> 58\%$ de los espermatozoide vivos.
- $\geq 4\%$ de espermatozoides morfológicamente normales.
- $< 1 \times 10^6$ leucocitos por campo.

Siguiendo estos valores de referencia y teniendo en cuenta su estudio macro y microscópico, los diagnósticos de las muestras recogidas en el estudio fueron los siguientes:

- Normozoospermia: todos los parámetros seminales se encontraron dentro de los rangos de normalidad.
- Oligozoospermia: la concentración de espermatozoides por ml o en total en el eyaculado, fue inferior al valor de referencia.
- Astenoospermia: la velocidad de tipo PR se encontró por debajo del valor de referencia.
- Teratoospermia: el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales fue menor al establecido.
- Necrozoospermia: el porcentaje de espermatozoides muertos fue superior al 42%.

Procesamiento de la muestra el día de la punción ovárica

Los varones que usaron su propia muestra seminal (homóloga) tuvieron que dejarla el mismo día de la punción de su pareja/donante o días previos a la punción, con el fin de mantenerla congelada hasta su uso. Por tanto, se usaron tanto muestras congeladas como obtenidas el mismo día de la punción.

Las muestras fueron obtenidas por masturbación en un bote de orina estéril tras mantener una abstinencia sexual entre 2 y 6 días. Se procesaron en un periodo máximo de 1

MATERIAL Y MÉTODOS

hora, manteniéndolas siempre a 37°C sobre una superficie calefactada. Tras la licuefacción, se valoraron tanto macro como microscópicamente y fueron diagnosticadas siguiendo los parámetros recomendados por la OMS 2010 (88) tal y como hemos detallado anteriormente.

La capacitación espermática y el método de *swim-up* de las muestras fueron requisitos previos para la realización de todas las ICSI.

La capacitación consiste en emplear una serie de lavados con gradientes de diferentes densidades que eliminan los leucocitos, bacterias, espermatozoides inmóviles y otras células no espermáticas presentes en el plasma seminal, permitiéndonos seleccionar y concentrar únicamente los espermatozoides móviles del eyaculado.

Aquellos pacientes que dejaron su muestra el día de la punción, tras una valoración inicial macro y microscópica de la calidad seminal, se procedió a la capacitación espermática. La capacitación se realizó en tubos NUNC® de 10 ml de fondo cónico (NUNC® CryoTube® Vials, Dinamarca) donde se dispusieron 0,5 ml de gradientes de densidad de 80% y 40%, con una proporción 8:2 y 4:6 de SPERMGRAD™ (VITROLIFE, Suecia) y G-IVF™ (VITROLIFE, Suecia) respectivamente.

Sobre los gradientes, previamente atemperados a 37°C, se incorporó entre 1 y 2 ml del eyaculado. El primer centrifugado se realizó durante 20 minutos a 1000 rpm. Tras recuperar el *pellet*, éste se resuspendió en 1 ml de G-IVF™ (VITROLIFE, Suecia). Para eliminar los restos de gradiente que pudieran haber quedado tras la primera centrifugación, se realizó un lavado a 1300 rpm durante 5 minutos. Tras este último lavado, se retiró el sobrenadante y, sobre el *pellet* se añadieron entre 0,15 y 0,3 ml de G-IVF™ (VITROLIFE, Suecia) sin homogeneizar (imagen 5).

El método de *swim-up* permite recoger los espermatozoides con mejor movilidad tras la capacitación. Para ello, en el último lavado de la capacitación, se añadió al *pellet* entre 0,15 y 0,3 ml de G-IVF™ (VITROLIFE, Suecia) y se dejó incubar durante unos minutos. Con esta técnica se consiguió que solo los espermatozoides con mejor movilidad migraran desde el *pellet* a la parte superior del medio y únicamente éstos, fueron usados para microinyectar los ovocitos (imagen 6).

Por tanto, la muestra seminal se capacitó y se mantuvo en estufa calefactada durante un periodo de tiempo que en ningún caso superó una hora, haciendo *swim-up* a 37°C hasta el momento de la ICSI.

MATERIAL Y MÉTODOS

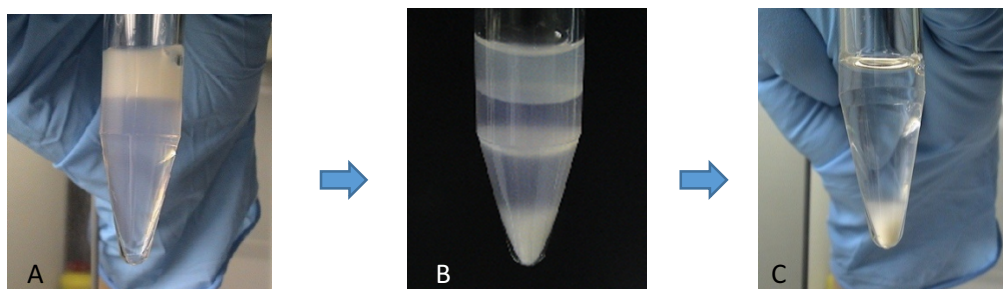


Imagen 5: Capacitación espermática. A) Gradientes de densidad sobre los que se deposita la muestra seminal. B) Tras la primera centrifugación se observan interfases entre las densidades separando los espermatozoides móviles (pellet) del resto de espermatozoides inmóviles y células no espermáticas que no han sido capaces de atravesar los gradientes. C) Tras la segunda centrifugación se retira el sobrenadante.



Imagen 6: A) Pellet resultante tras la capacitación espermática y preparado para realizar el swim-up. B) Transcurridos unos minutos en estufa a 37°C, se puede observar una nebulosa sobre él correspondiente a aquellos espermatozoides con mejor movilidad que han sido capaces de migrar hacia la parte superior.

De modo similar, cuando los pacientes dejaron su muestra días previos para realizar una congelación, ésta se mantuvo criopreservada en N₂ líquido hasta su utilización.

De igual manera, la muestra se obtuvo por masturbación en un bote de orina estéril con un periodo de abstinencia sexual entre 2 y 6 días. Tras la licuefacción y valoración macro y microscópica, se procedió con la capacitación tal y como hemos descrito anteriormente.

El volumen final del capacitado se congeló con el crioprotector SPERM FREZEE™ (FERTIPRO, Bélgica) en una proporción 1:0,7 ml en un criotubo (NUNC® CryoTube® Vials, Dinamarca). La adición del crioprotector se realizó muy lentamente, gota a gota, para evitar un choque osmótico a los espermatozoides. Tras 10 minutos a temperatura ambiente, la muestra

MATERIAL Y MÉTODOS

se congeló lentamente en vapores de N₂ líquido durante 20 minutos o, en pequeñas porciones o píldoras usando una pastilla de nieve carbónica. Posteriormente la muestra se quedó almacena en nuestro banco de N₂ líquido.

Una vez llegado el día de la punción de la paciente o donante de ovocitos, se descongeló la muestra manteniéndola a 37°C durante 15 minutos. Para retirar el crioprotector, se realizó un lavado a 1300 rpm durante 5 minutos. Tras retirar el sobrenadante se añadió sobre el *pellet* entre 0,15 y 0,3 ml de G-IVF™ (VITROLIFE, Suecia). Acto seguido, se mantuvo haciendo *swim-up* en estufa calefactada a 37°C hasta el momento de la ICSI, nunca superando el límite de 1 hora.

Análisis del índice de fragmentación del ADN espermático (IFE)

La cromatina espermática está muy organizada dentro de los espermatozoides. Es una estructura compacta que consta de ADN y nucleoproteínas heterogéneas. La integridad del ADN es esencial para la correcta transmisión de la información genética paterna, teniendo así, una gran importancia en la formación y desarrollo del embrión.

El análisis del IFE mediante la técnica de citometría de flujo mide el porcentaje de espermatozoides con roturas en la cadena de ADN mediante su desnaturalización inducida por un pH bajo. Se expresa como índice de fragmentación del ADN espermático (IFE) y es una medida precisa y repetible. Además, mediante esta técnica, se identifica simultáneamente el porcentaje de espermatozoides con un desarrollo nuclear inmaduro.

El protocolo para cuantificar el IFE mediante citometría de flujo fue descrito por Evenson y su equipo en 1999 (76). En nuestro centro, cada muestra de semen destinada a dicho análisis, fue congelada en N₂ líquido sin crioprotector y transportada a la Universidad de León para la realización de dicha técnica. Se recogieron dos alícuotas de cada muestra y se evaluaron aproximadamente 5.000 células espermáticas por citometría de flujo. Se determinó la alta estabilidad del ADN basándose en el porcentaje de espermatozoides con altos niveles de fluorescencia de color verde. Por tanto, para determinar el IFE de toda la población de espermatozoides se utilizaron citogramas nativos (fluorescencia verde, eje y) enfrentados a los citogramas correspondientes a los espermatozoides fragmentados (fluorescencia roja, eje X). De esta manera, el IFE se cuantificó basándose en el aumento de la fluorescencia del cociente

MATERIAL Y MÉTODOS

verde/[rojo+verde] de cada espermatozoide. Se consideró una muestra alterada cuando el IFE fue igual o superior al 27% (figuras 1 y 2).

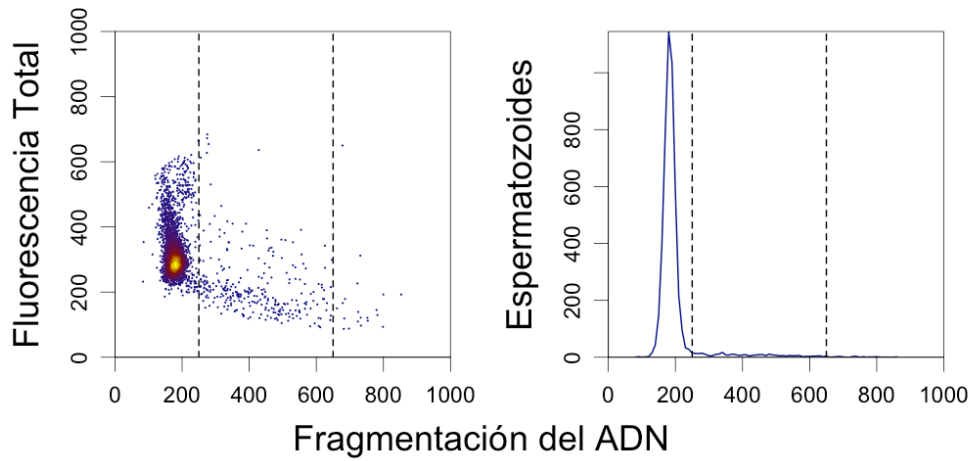


Figura 1: Gráfica correspondiente a un IFE de 6,64% (normal).

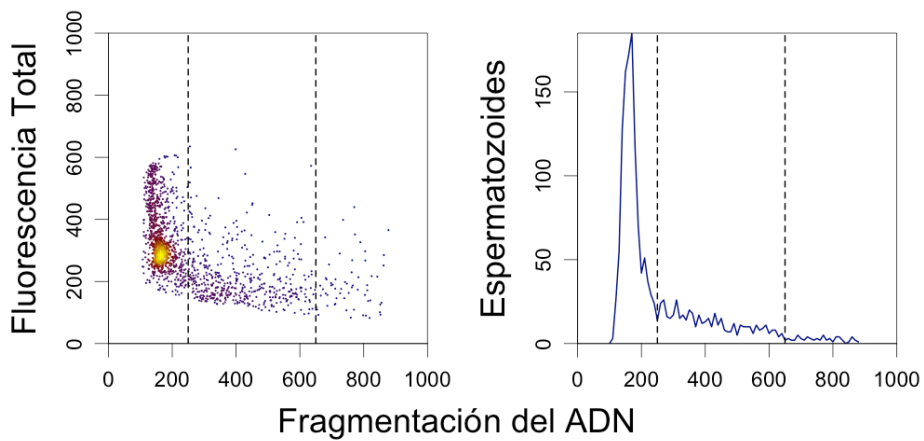


Figura 2: Gráfica correspondiente a un IFE de 31,02% (alterado).

Para realizar la prueba del IFE, las muestras fueron recogidas con una abstinencia sexual entre 1 ó 2 días.

MATERIAL Y MÉTODOS

En nuestro centro, los pacientes candidatos a la realización de esta prueba fueron aquellos con ciclos previos de FIV fallidos, abortos de repetición o pacientes con infecciones genitourinarias.

PACIENTES CON SEMEN DE DONANTE

Cuando no se pudo disponer de la muestra espermática del varón se procedió a utilizar un donante de semen (heterólogo). Las mujeres sin pareja o con parejas homosexuales también se incluyeron en este grupo de estudio.

Selección de donantes de semen

La selección y aceptación de donantes de semen en nuestro centro se realizó siguiendo el marco jurídico regulador de reproducción asistida en España, constituido actualmente por la Ley 14/2006 del 26 de Mayo. Siguiendo esta ley, todas las donaciones fueron anónimas y no lucrativas, seleccionándose donantes mayores de edad y que no superaran los 35 años, con un estado psicofísico adecuado y con no más de 6 hijos.

En una primera fase de selección se realizó un estudio personal (historia reproductiva, hábitos, enfermedades hereditarias del entorno familiar, etc.). Posteriormente, se les sometió a un análisis seminal realizándoles un seminograma completo y una prueba de congelación y descongelación.

Si la calidad seminal superó los valores de referencia establecidos por la OMS 2010 (88) para considerar una muestra normozoospermica, el donante fue aceptado como donante provisional.

En la segunda fase de selección, el donante provisional firmó un contrato formal y confidencial concertado entre el donante y el banco de semen y se procedió a la realización de las analíticas que nos exigió la ley. Dichas analíticas comprendieron:

- Grupo sanguíneo y factor Rh, hemograma completo y serologías para descartar enfermedades de transmisión sexual (HBV, HCV, HIV y sífilis).
- Cultivo seminal para descartar cualquier tipo de infección bacteriana que pudiera tener.
- Cultivo de orina para descartar la presencia de *Chlamydia trachomatis*.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Cariotipo en sangre periférica para garantizar que no existe ningún tipo de enfermedad hereditaria.

Finalmente, se recogieron los datos personales y rasgos fenotípicos como la raza, peso, talla, color de ojos y color y textura de pelo.

Una vez que todos los resultados de las pruebas fueron correctos, el donante se quedó registrado como donante de nuestro banco de semen. Durante su periodo de donación, todas las muestras de semen fueron criopreservadas y almacenadas en nitrógeno líquido en nuestro banco para su uso en diferido.

Procesamiento de la muestra el día de la punción ovárica

El día que se congeló la muestra del donante, ésta se obtuvo por masturbación en un bote de orina estéril y con un periodo de abstinencia entre 2 y 6 días. Tras la licuefacción y la valoración macro y microscópica, se procedió con la capacitación tal y como hemos descrito anteriormente para pacientes como semen homólogo. El volumen capacitado se congeló con el crioprotector SPERMFREEZE™ (FERTIPRO, Bélgica) en una proporción 1:0,7 ml. Tras 10 minutos a temperatura ambiente, la muestra se congeló lentamente en vapores de nitrógeno líquido durante 20 minutos. Posteriormente se almacenaron en N₂ líquido en nuestro banco.

El mismo día de la congelación, se descongeló una alícuota de la muestra criopreservada a 37° C durante 15 min para valorar la supervivencia espermática tras el proceso de congelación y posterior descongelación.

Una vez llegado el día de la punción de la paciente o donante de ovocitos, se descongeló la muestra manteniéndola a 37° C durante 15 minutos. Para retirar el crioprotector, se realizó un lavado a 1300 rpm durante 5 minutos. Tras retirar el sobrenadante se añadió sobre el *pellet* entre 0,15 y 0,3 ml de G-IVF™ (VITROLIFE, Suecia). Una vez lavada, la muestra se mantuvo haciendo *swim-up* en estufa calefactada a 37° C hasta el momento de la microinyección, nunca superando el límite de 1 hora.

1.3. OBTENCIÓN DE EMBRIONES

Para la obtención de los embriones, primero se tuvo que llevar a cabo la recuperación de los ovocitos del líquido folicular iniciándose así, una serie de acontecimientos cuyo objetivo

MATERIAL Y MÉTODOS

final fue conseguir el nacimiento de un niño sano. Para ello, el laboratorio de FIV proporcionó las condiciones necesarias para que los ovocitos experimentasen adecuadamente el proceso de fecundación y posterior desarrollo embrionario.

Los embriones estuvieron en cultivo en el laboratorio durante cinco o seis días, evaluándose cada día sus características morfológicas según los criterios de ASEBIR (12) que, junto con la experiencia del embriólogo/a, nos llevó a poder seleccionar cuál fue el mejor embrión/es para transferir y/o criopreservar.

PUNCIÓN OVÁRICA

La recuperación de ovocitos o punción ovárica, es una intervención ambulatoria que se realiza para recuperar los ovocitos de los ovarios tras 32-36 h de haber inducido la ovulación con la hCG.

Normalmente se emplea anestesia general para conseguir un estado de sedación profunda utilizando los siguientes fármacos: propofol (2-3 mg/kg), atropina 0,5 mg, fentanilo 0,75 mg y analgésicos intravenosos una vez finalizada la punción.

La punción se realizó mediante una ecografía vaginal que permitió visualizar los folículos en los ovarios. Para la recuperación de los ovocitos, se utilizó un transductor vaginal acoplado a una aguja especialmente diseñada para perforar los folículos del ovario y aspirar el líquido folicular. Esta aguja estuvo unida a un aspirador eléctrico (LABOTECH GmbH Labor-Technik, Göttingen, Alemania) que le confirió la presión negativa necesaria para aspirar el contenido de los folículos sin dañar los ovocitos. El líquido folicular aspirado pasó directamente a un tubo a través del sistema conectado a la aguja de punción. De esta manera, los tubos con los líquidos foliculares llegaron al laboratorio de FIV donde se procedió a la captación de los complejos cúmulo-corona-ovocito (CCOO) de su interior.

Los tubos con los líquidos fueron vaciados sobre placas de Petri de 100x15 mm (BECTON, Dickison and Company, Reino Unido) precalentadas y, bajo un microscopio estereoscópico se procedió a la búsqueda y captación de los CCOO por inspección directa mediante un sistema de aspiración acoplado a una pipeta *Pasteur* estéril de 5.75 (HUMAGEN™ Fertility Diagnostics, EEUU). Todo ello, en cabina de flujo laminar con superficie calefactada y sistema de CO₂ acoplado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los CCOO fueron lavados en placas de Petri de 60x15 mm (NUNC™, Dinamarca) con G-MOPS PLUS™ (VITROLIFE, Suecia). Finalmente, los cúmulos obtenidos se incubaron durante 2 horas a 37°C en las estufas incubadoras G-185 (K-SYSTEMS, Noruega) en placas multipocillos NUNC™ IVF MULTIDISH (NUNC™, Dinamarca), con medio de cultivo G-IVF™ PLUS (VITROLIFE, Suecia) y recubierto con aceite de parafina filtrado OVOIL™ (VITROLIFE, Suecia) hasta el proceso de decumulación.

DECUMULACIÓN DE LOS CCOO

Los ovocitos que fueron microinyectados debieron pasar por el proceso de decumulación, en el cual se eliminan mediante un conjunto de métodos enzimáticos y mecánicos las células del cúmulo que los rodea. El objetivo de este proceso fue valorar el grado de madurez ovocitaria y facilitar su manipulación durante la microinyección.

La decumulación de los CCOO se realizó en placas de Petri 60x15 mm (NUNC™, Dinamarca) usando una mezcla de hialuronidasa HYASE™-10X (VITROLIFE, Suecia) y medio tamponado G-MOPS™ PLUS (VITROLIFE, Suecia) en una relación 1:9 y G-MOPS™ PLUS (VITROLIFE, Suecia).

Utilizando pipetas *Pasteur* de 5.75 (HUMAGEN™ Fertility Diagnostics, EEUU), los CCOO fueron pasados por microgotas de la mezcla hialuronidasa-medio tamponado para posteriormente dejarlos sobre las microgotas de G-MOPS™ PLUS (VITROLIFE, Suecia). Mediante Stripper Tips (ATLANTIC DIAGNOSTICS, América) de diámetros comprendidos entre los 135 y 150 nm, se procedió a la decumulación mecánica de los ovocitos.

Tras el proceso de decumulación, los ovocitos se pasaron de forma individualizada a placas de Petri de 60x15 mm (NUNC™, Dinamarca) preparadas con microgotas de G-IVF™ PLUS (VITROLIFE, Suecia) recubiertas con aceite OVOIL™ (VITROLIFE, Suecia), donde se evaluó su estado de madurez bajo un microscopio invertido.

El estado de madurez de los ovocitos (imagen 7) se clasificó en:

- Metafase II (MII): ovocitos en segunda división meiótica donde se observó el corpúsculo polar (CP). Estos óvulos fueron aptos para la microinyección.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Metafase I (MI): ovocitos en primera división meiótica donde no se observó el CP. Se mantuvieron en incubación un tiempo prudencial a la espera de la extrusión del CP, convirtiéndose en MII si lo consiguieron. Si no lo consiguieron, fueron descartados.
- Profase-I (P-I): ovocitos en la primera profase donde se observó la vesícula germinal (VG) correspondiente a dicha fase meiótica. Estos óvulos no fueron aptos para la microinyección.

Solamente fueron microinyectados aquellos ovocitos en MII en el momento de la microinyección.



Imagen 7: A) Ovocito en MII. B) Ovocito en MI. C) Ovocito en VG.

SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES Y MICROINYECCIÓN ESPERMÁTICA

La técnica de microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) fue desarrollada por Palermo y su equipo (6) en Bélgica, y con ella se revolucionó el tratamiento del factor masculino severo ya que, requiere un único espermatozoide vivo por ovocito.

La decumulación de los ovocitos no solo fue útil para determinar qué ovocitos microinyectar sino que también, facilitó su manipulación a la hora de realizar la ICSI. Sin las células del CCOO se pudo orientar fácilmente el ovocito y el CP de manera que se pudo evitar dañar el huso meiótico.

La selección de espermatozoides se realizó en un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000S con superficie calefactada a 37°C y con micromanipuladores donde se acoplaron las

MATERIAL Y MÉTODOS

micropipetas Holding e ICSI (MICROPIPETES HUMAGEN™ Fertility Diagnostics, EEUU) para poder sujetar y microinyectar el ovocito.

Para la microinyección se utilizaron placas de Petri de 60x15 mm (NUNC™, Dinamarca) con dos gotas de 15µl de un medio de alta viscosidad de polyvinylpyrrolidona (PVP) y albúmina humana recombinante (ICSI™ VITROLIFE, Suecia) y varias microgotas de G-MOPS™ PLUS (VITROLIFE, Suecia), recubriéndose todas ellas con aceite OVOIL™ (VITROLIFE, Suecia). El PVP se empleó por su alta viscosidad y su incomprensibilidad para, por un lado, evitar que los espermatozoides se movieran de forma rápida posibilitando así su manipulación, y por otro, facilitar el control del espermatozoide dentro de la micropipeta ICSI.

En una de las microgotas de ICSI™ (VITROLIFE, Suecia) se dispusieron entre 1-3 µl del *swim-up* de la muestra espermática. En la otra microgota, se equilibró y enfocó la micropipeta de ICSI y se procedió a la selección de los espermatozoides.

Utilizando el objetivo de 40 aumentos, los espermatozoides fueron seleccionados por su morfología según los criterios de la OMS 2010 (88), y aspirados a través de la micropipeta de ICSI, para posteriormente inmovilizarlos golpeando la cola con la micropipeta (imagen 8).

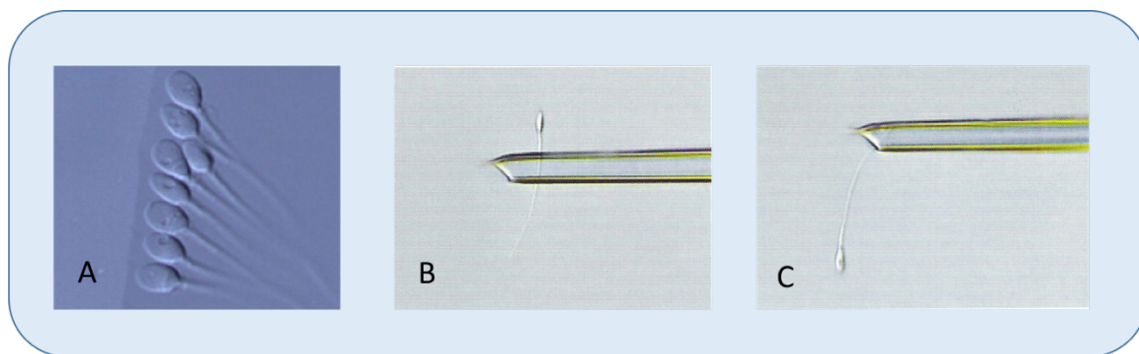


Imagen 8: A) Selección de espermatozoides morfológicamente normales. B) Inmovilización del espermatozoide mediante un golpe en la cola con la micropipeta de ICSI. C) Captura del espermatozoide inmovilizado para la microinyección.

Estos espermatozoides inmovilizados fueron los que se usaron para microinyectar los ovocitos dispuestos en las microgotas de G-MOPS™ PLUS (VITROLIFE, Suecia) con la ayuda de la micropipeta HOLDING. Dicha micropipeta, sujeta el ovocito mientras que la micropipeta de ICSI introduce suave y gradualmente el espermatozoide en el interior del citoplasma del ovocito (imagen 9).

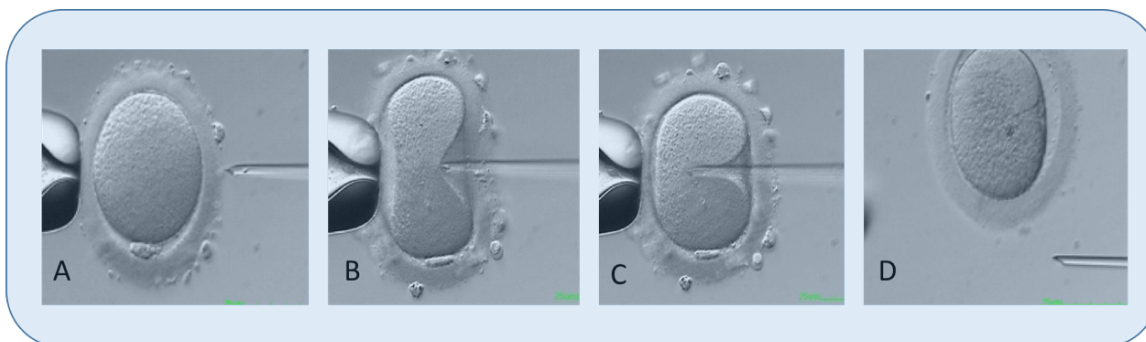


Imagen 9: A) Correcta orientación del ovocito por la succión de la micropipeta de HOLDING (izquierda) y enfoque del espermatozoide en la micropipeta de ICSI (derecha). B) Introducción de la ICSI a través de la ZP para llegar al citoplasma. C) Inyección del espermatozoide en el citoplasma ovocitario. D) Formación del cono de microinyección en el citoplasma del ovocito tras dejar el espermatozoide dentro.

Los ovocitos recién microinyectados se cultivaron de forma individualizada en placas de Petri de 35x10 mm (NUNC™, Dinamarca) con microgotas de G-1 PLUS™ (VITROLIFE, Suecia) recubiertas con aceite OVOIL™ (VITROLIFE, Suecia), y se mantuvieron en cultivo en las estufas incubadoras hasta el día siguiente.

DESARROLLO EMBRIONARIO

Los embriones estuvieron en el laboratorio hasta el día 5 ó 6 de desarrollo, por lo que se debieron cultivar en óptimas condiciones para favorecer su desarrollo hasta el estadio de blastocisto. Para ello, los medios de cultivo debieron mantener estables los parámetros de pH, osmolaridad y temperatura.

Todos los embriones fueron incubados en estufas con trigas. Los embriones *in vivo*, nunca están expuestos a tensiones de oxígeno superiores al 8% (43). Por ello, estas incubadoras estuvieron conectadas a un suministro continuo de CO₂ y N₂ capaces de crear una atmósfera de oxígeno reducido en su interior (6% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂). Para conseguirlo, el N₂ aumenta su presión parcial y desplaza el aire atmosférico consiguiendo que el O₂ este al 5%, optimizando así el desarrollo de los embriones a estado de blastocisto (45, 46, 89).

Los embriones se observaron en un microscopio invertido (Nikon TE 2000S) a 400 aumentos, con un objetivo de contraste modular y pletina calefactada (TOKAI™, OLYMPUS Corp., Japón). Para comprobar su evolución, se observaron cada 24 h, registrando sus características morfológicas para su posterior clasificación embrionaria.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el sistema de clasificación embrionaria desde día +2 a +6 de desarrollo (imagen 10), se utilizó la opción de cuatro categorías divididas en función del potencial de implantación esperado según los criterios de ASEBIR (12), siendo:

- Categoría A: calidad embrionaria óptima y máxima capacidad de implantación.
- Categoría B: calidad embrionaria buena y elevada capacidad de implantación.
- Categoría C: calidad embrionaria media con una capacidad media de implantación.
- Categoría D: embrión de no muy buena calidad con baja probabilidad de implantación.



Imagen 10: Desarrollo embrionario desde día +0 a +6 postpunción.

Día +1

La interacción entre el gameto femenino y masculino implica una serie ordenada de cambios morfológicos que afectan al aspecto celular del ovocito provocando la extrusión del segundo CP y la aparición los pronúcleos (PN), uno femenino y otro masculino (imagen 11). El PN masculino se forma por la descondensación de la cromatina del espermatozoide. En el interior de los PN pueden distinguirse los cuerpos precursores de los nucléolos (CPN), los cuales se juntan y se dirigen hacia la zona de contacto de los dos PN.

MATERIAL Y MÉTODOS

Siguiendo las pautas de ASEBIR (12), un cigoto correctamente fecundado fue aquel que presentó dos PN y dos CP. La evaluación de la fecundación se realizó entre las 16-20 h tras la microinyección.

Los ovocitos correctamente fecundados se clasificaron en función del número y posición de los CPN y de la localización de los CP respecto a los PN, siguiendo los criterios de Scott y Smith 1998 (90).

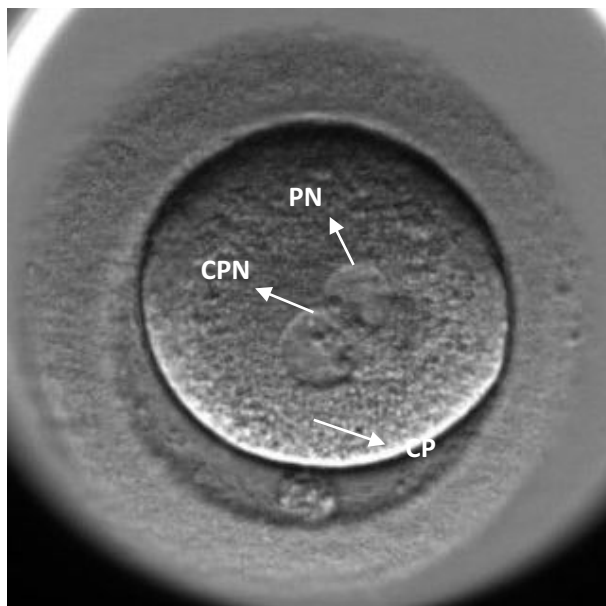


Imagen 11: Ovocito correctamente fecundado con 2 CP y 2 PN. Se pueden observar los CPN en el interior de los PN.

En día +1, los embriones se pasaron de forma individualizada a placas de Petri de 35x10 mm (NUNC™, Dinamarca) con microgotas de G-2 PLUS™ (VITROLIFE, Suecia) recubiertas con aceite OVOIL™ (VITROLIFE, Suecia) y, se mantuvieron en cultivo en las estufas incubadoras hasta día +3.

Día +2

En día +2 de desarrollo se produjo la primera división embrionaria y, coincidiendo con las 44 h tras la ICSI, se evaluaron los embriones en función del ritmo de división, porcentaje de fragmentación, alteraciones citoplasmáticas, multinucleación, simetría y presencia de vacuolas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se consideraron óptimos aquellos embriones que tuvieron entre 2 y 5 células y, se descartaron aquellos que habían parado su desarrollo o que presentaron un alto porcentaje de vacuolas (>50%) y/o alta fragmentación (>50%) (imagen 12).

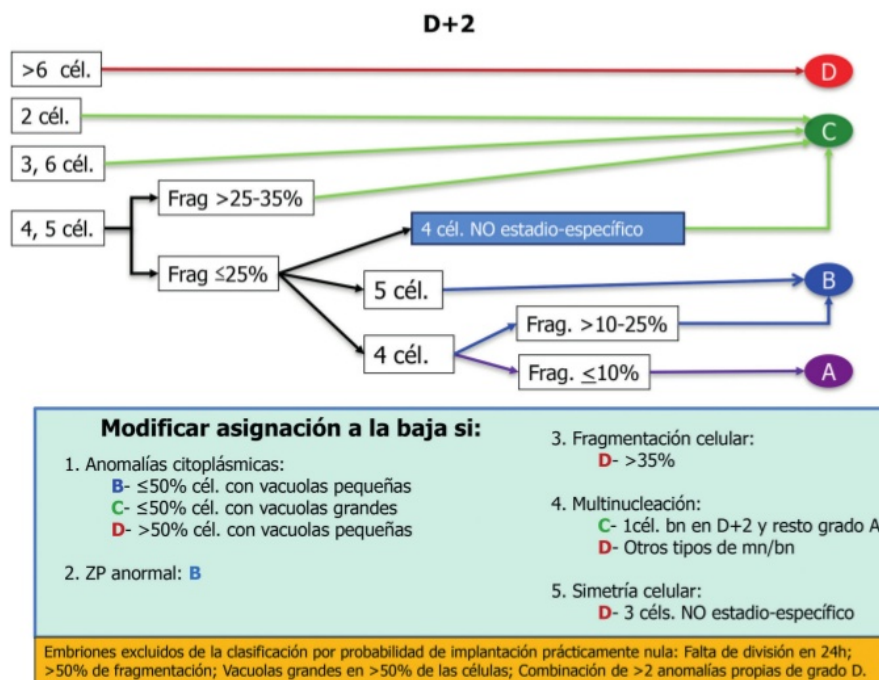


Imagen 12: Clasificación ASEBIR 2015 en día +2.

Día +3

En día +3 de desarrollo se evaluó la calidad embrionaria entre las 67-72 h tras la microinyección teniendo en cuenta las características citadas en el apartado anterior y su evolución desde día +2 (imagen 13).

MATERIAL Y MÉTODOS

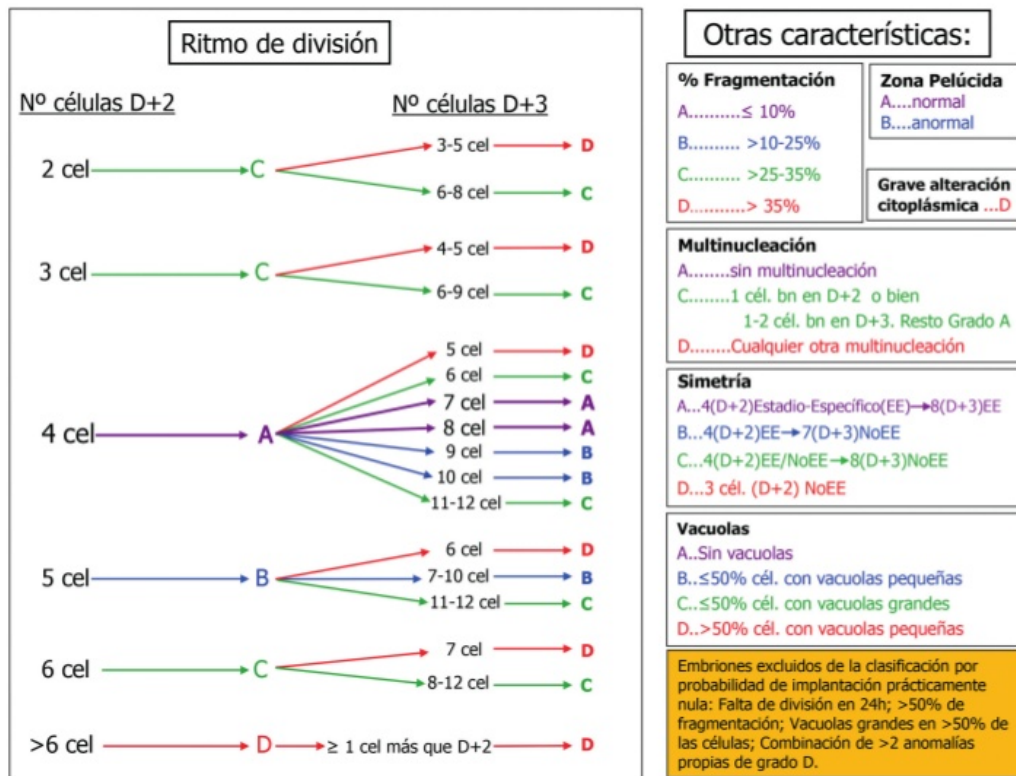


Imagen 13: Clasificación ASEBIR 2015 de día +2 a +3.

Se consideraron óptimos aquellos embriones que tuvieron entre 6 y 10 células y, se descartaron aquellos embriones parados y/o inviábiles por alta tasa de fragmentación o alto porcentaje de vacuolas (Imagen 14).

A los embriones se les cambió de medio de cultivo de forma individualizada a placas de Petri de 35x10 mm (NUNC™, Dinamarca) con microgotas de G-2 PLUS™ (VITROLIFE, Suecia) recubiertas con aceite OVOIL™ (VITROLIFE, Suecia), y se mantuvieron en cultivo en las estufas incubadoras hasta día +5 o +6.

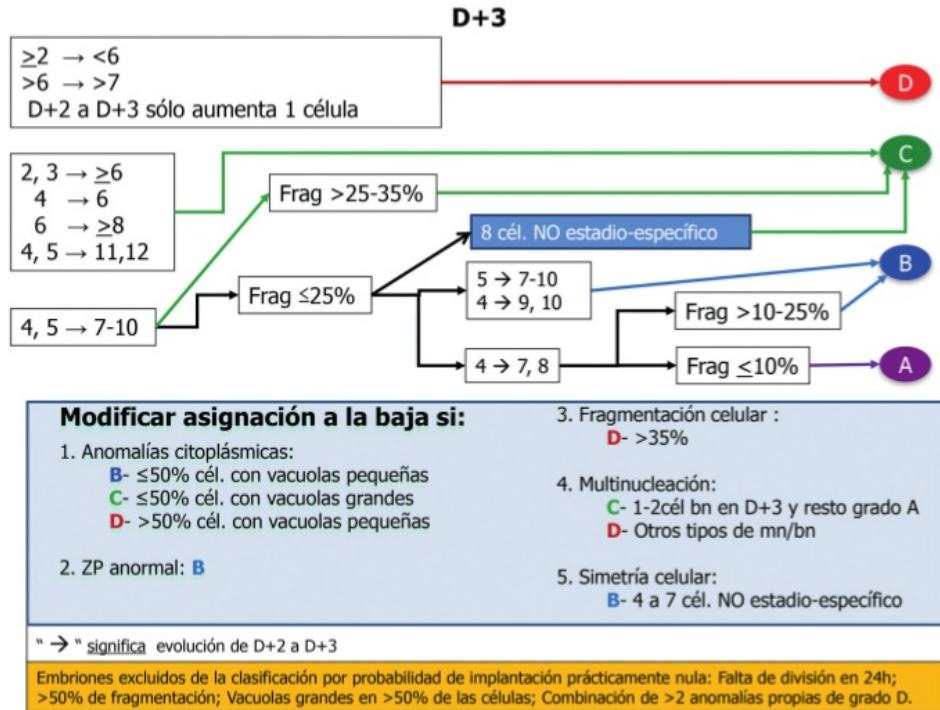


Imagen 14: Clasificación ASEBIR 2015 día +3.

Día +4

Cuando se evaluaron los embriones en día +4, se tuvo que observar un embrión entre 16 y 32 células denominado mórula. A continuación las blastómeras o células de la mórula se fueron compactando formando lo que denominamos mórula compacta.

Por tanto, en este estadio de desarrollo se tuvieron en cuenta la llegada o no a mórula y la compactación o no de la misma (Imagen 15 y 16).

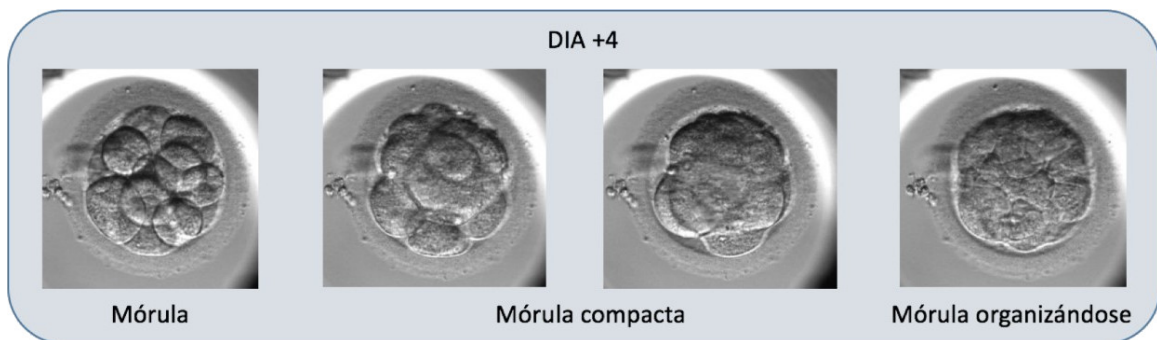



Imagen 15: Clasificación de mórulas en día +4.

D+3	Características morfológicas D+4	D+4
A	Cavitación temprana Compactación total y >8 células	A
	Compactación parcial (1-2 cél. excluidas)	B
	Compactación parcial (>2 cél. excluidas) No compactación (> 8 cél.)	C
B	Cavitación temprana Compactación total y >8 células Compactación parcial (1-2 cél. excluidas)	B
	Compactación parcial (>2 cél. excluidas) No compactación (> 8 cél.)	C
C	Cavitación temprana Compactación total y ≥8 células	C
D	Compactación parcial	D
	Cualquier característica	

Cualquier embrión que presente en D+4:

- Fragmentación celular >35%
- Excesiva vacuolización.
- ≤8 células sin signos de compactación o con compactación de <50% del embrión.



Embriones excluidos de la clasificación por probabilidad de implantación prácticamente nula: Falta de división en 24 horas y embriones que presentan una combinación de >2 características propias de la categoría D.

Imagen 16: Clasificación ASEBIR 2015 en día +4.

Día +5 y +6

El blastocisto se empezó a constituir tras la compactación celular, momento en que empezó a formarse una cavidad denominada blastocele y comenzó a producirse la diferenciación celular.

En día +5 y +6 de desarrollo embrionario, se evaluó la calidad del blastocisto y su llegada o no a dicho estadio (imagen 17).

Para la clasificación morfológica de los blastocistos, se tuvieron en cuenta parámetros tales como el grado de expansión, la MCI y el TE, además de, el día de llegada a blastocisto (Imágenes 18-21).

MATERIAL Y MÉTODOS

Existen varios criterios para su valoración:

- Según el grado de expansión:
 - Blastocisto temprano: comenzó a formarse la cavidad y empezó la diferenciación celular.
 - Blastocisto cavitando: el blastocele ocupó más del 50% del volumen del embrión.
 - Blastocisto expandido: se observó el blastocele rodeado por una monocapa celular o TE, que formará la placenta, y una MCI que dará lugar al embrión. Con la expansión del embrión se produjo un aumento del volumen y una disminución de la ZP del embrión.
 - Blastocisto en eclosión o *hatching*: el blastocisto comenzó a salir a través de la ZP.
 - Blastocisto eclosionado o *hatched*: el blastocisto estuvo completamente fuera de la ZP.
- Según el tipo de MCI:
 - Tipo A: MCI compacta, con muchas células, bien definida.
 - Tipo B: MCI con bastantes células agrupadas y de aspecto laxo.
 - Tipo C: MCI con muy pocas células.
 - Tipo D: MCI ausente o degenerada.
- Según el TE:
 - Tipo A: TE completo, formado por muchas células.
 - Tipo B: TE incompleto, con alguna zona lineal.
 - Tipo C: TE con muy pocas células.
 - Tipo D: TE liso o generado.

MATERIAL Y MÉTODOS

D+4	D+5			
	Grado de expansión	MCI	Trofoectodermo	ASEBIR
Mórula compacta	Desde: "Iniciando la expansión" Hasta: "Eclosionando"	A	A	A
			B	B
			C	C
			D	D
		B	A	A
			B	B
			C	C
			D	D
		C	A	A
			B	B
C	C			
D	D			
D	A,B,C o D	D		
Blastocisto temprano o cavitando (ZP gruesa)				C
Mórula no compacta	Mórula			D

Imagen 17: Clasificación ASEBIR 2015 de día +4 a +5.

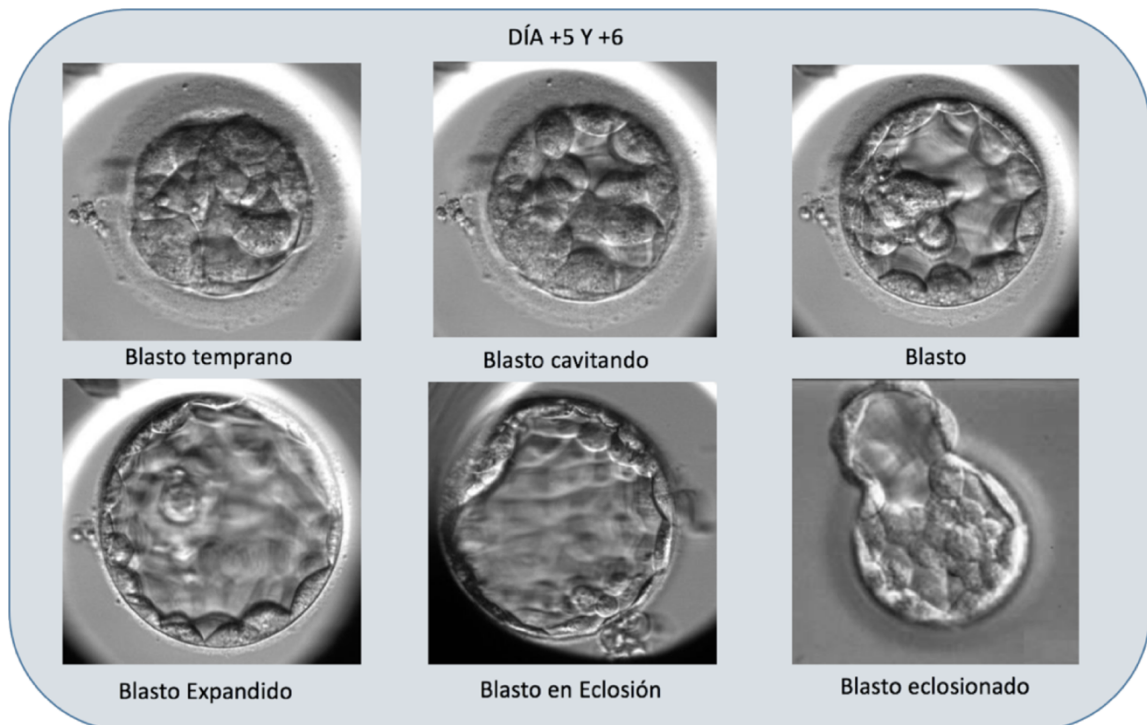


Imagen 18: Clasificación de blastocistos en día +5 y +6 en función de su evolución.

MATERIAL Y MÉTODOS

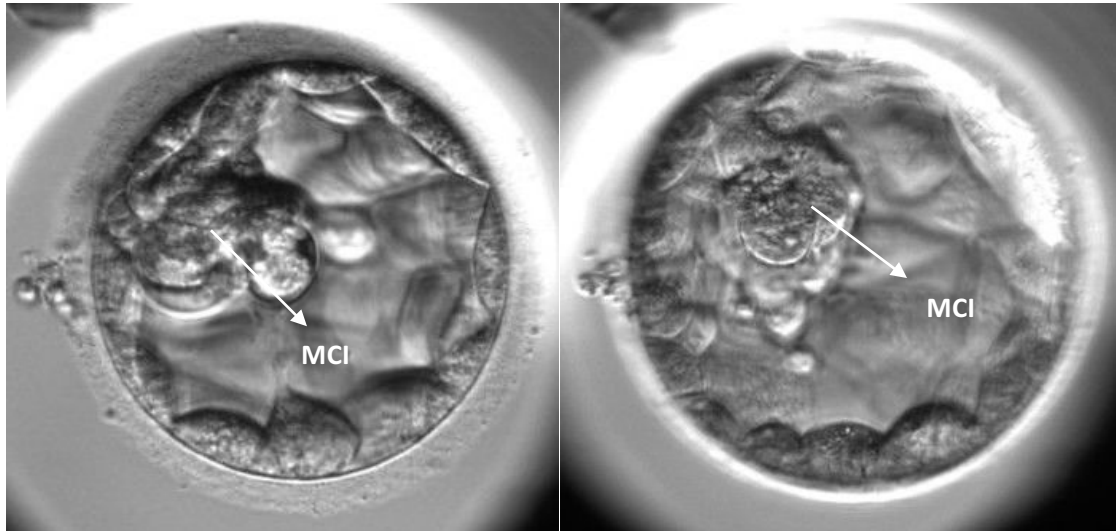


Imagen 19: Masa celular interna (MCI) en blastocistos expandidos. Estas células darán lugar al disco embrionario y finalmente al embrión. Son células madre embrionarias pluripotenciales con capacidad para diferenciarse en muchos tipos celulares del organismo durante el desarrollo.

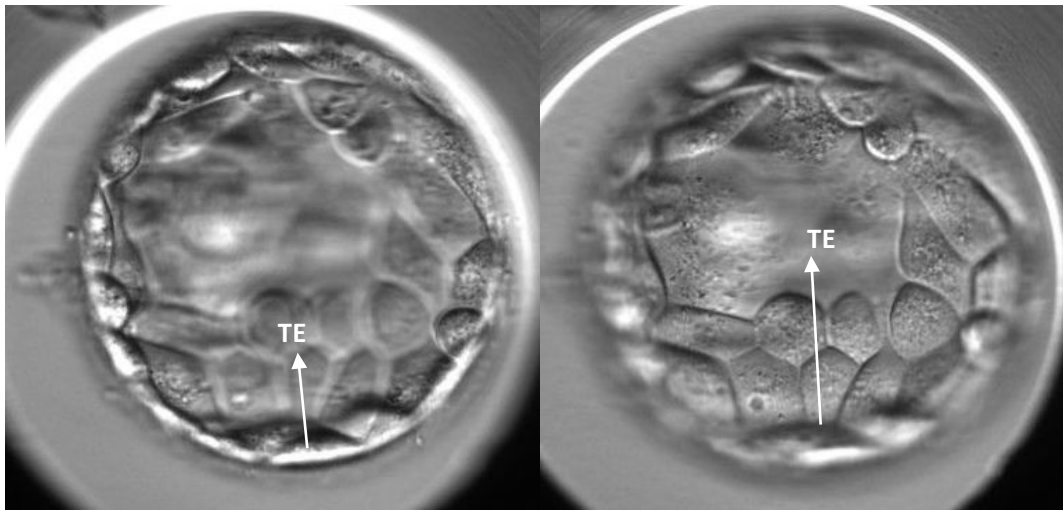


Imagen 20: Trofoectodermo (TE) en blastocistos expandidos. El trofoectodermo es el epitelio precursor de la placenta y el primer componente del sistema de estructuras extraembrionarias.

D+5	D+6			
	Grado de expansión	MCI	Trofoectodermo	ASEBIR
Blastocisto temprano o cavitando (ZP gruesa)	Desde: "Iniciando la expansión"	A	A	B
			B	
			C	
			D	
	Hasta: "Eclosionando"	B	A	B
			B	
			C	
			D	
	C	C	A	B
			B	
C				
D	D	A,B,C o D	D	
		D		
Blastocisto temprano o cavitando (ZP gruesa)				D
Mórula no compacta	Mórula		Excluidos	

Imagen 21: Clasificación ASEBIR 2015 de día +5 a +6.

TRANSFERENCIA DE BLASTOCISTOS

En todos los casos, las transferencias embrionarias se realizaron en día +5 post punción en estado de blastocisto.

La transferencia de embriones consiste en una técnica ecoguiada mediante la cual se depositan los embriones en el fondo del útero utilizando una catéter fino, que se introduce vía vaginal y llega hasta el tercio medio del útero atravesando el cérvix. El proceso dura unos pocos minutos y no se precisa de sedación.

La transferencia en este estadio permitió:

- Obtener embriones con mayor capacidad de implantación, ya que no todos los embriones fueron capaces de llegar a este estadio.
- Tener una mejor sincronía entre el embrión y el endometrio, ya que fisiológicamente el embrión se encuentra en la trompa de Falopio en los primeros estadios de desarrollo y es en estado de mórula cuando llega al útero.

MATERIAL Y MÉTODOS

El embrión o embriones que fueron transferidos, fueron seleccionados a primera hora de la mañana del día +5 de desarrollo. Únicamente aquellos embriones más evolucionados, con mejor calidad (A, B, C, D) y cuyo desarrollo embrionario fue correcto según los criterios anteriormente descritos, fueron los que se transfirieron.

Los embriones seleccionados para transferir se cultivaron en una placa de cultivo multipocillos (NUNC™ IVF MULTIDISH, Dinamarca) con G-2™ PLUS (VITROLIFE, Suecia) en las estufas incubadoras hasta el momento de la transferencia embrionaria.

El resto de los embriones viables fueron criopreservados en nuestro banco de embriones. Estos embriones podrán ser transferidos en ciclos sucesivos, para los cuales la paciente ya no tendrá que someterse a la estimulación ovárica sino, a una preparación endometrial.

La decisión de transferir uno o dos embriones se tomó en función del consenso entre la pareja-embriólogo-ginecólogo, la historia clínica y/o la calidad embrionaria o número total de embriones en el ciclo. Actualmente, la ley de reproducción asistida no permite transferir más de tres embriones en una misma transferencia.

La transferencia fue ecoguiada y se realizó vía intrauterina mediante sondas Gynetics (GYNÉTICS MEDICAL PRODUCTS, Bélgica) o Labotect (LABOTECT, Alemania), según la facilidad de acceso al útero.

La carga de los embriones se realizó una vez que el ginecólogo tuvo a la paciente preparada. Los embriones se cargaron con la mínima cantidad de medio de cultivo G-2 PLUS™ (VITROLIFE, Suecia) y, una vez depositados dentro de la cavidad uterina, se comprobó bajo la lupa estereoscópica (NIKON, Japón), que los embriones no habían quedado retenidos en la cánula.

Para una buena transferencia, fue de vital importancia que las pacientes dispusieran de las instrucciones necesarias relacionadas con este paso. Según nuestro protocolo, las pacientes acudieron a la transferencia con la vejiga llena, consiguiéndose así, una mejor visualización del útero por ecografía abdominal y, con la medicación administrada de forma correcta, para que el grosor, aspecto y calidad del endometrio fuera adecuado para la implantación de los embriones.

MATERIAL Y MÉTODOS

En los casos en los que se confirmó gestación, se mantuvo la administración de estrógenos y progesterona en la misma pauta que se había estado administrado previamente, hasta un máximo de 100 días (8-12ª semana de gestación), disminuyendo la dosis de una manera progresiva.

CRIOPRESERVACIÓN DE LOS EMBRIONES

Los embriones que no se transfirieron y fueron viables en día +5 o +6 postpunción, se criopreservaron mediante el procedimiento de vitrificación embrionaria.

La vitrificación puede definirse como una elevación extrema de la viscosidad, con el objetivo de evitar la formación de cristales de hielo que aparecen como consecuencia de la solidificación (91). Los ovocitos y los embriones son sensibles a la formación de dichos cristales, por tanto, la eliminación de este tipo de lesiones puede aumentar sus posibilidades de supervivencia.

Durante la vitrificación, el líquido se vuelve cada vez más viscoso hasta que las moléculas quedan inmobilizadas, dejando el estado líquido y adquiriendo propiedades del sólido. Este fenómeno puede conseguirse aplicando una velocidad extrema de enfriamiento o utilizando altas concentraciones de soluciones crioprotectoras. La alta velocidad de enfriamiento requerida puede lograrse mediante la inmersión directa en N₂ líquido. Los métodos desarrollados para la vitrificación en embriología usan una combinación de estas dos posibilidades (92).

La vitrificación se llevó a cabo mediante el kit *Vitrification Media* (KITAZATO BioPharma, Japón) en placas de Petri de 35x10 mm (NUNC™, Dinamarca). Para ello, los embriones se transfirieron a una solución de equilibrio (ES) a 27°C durante 12 min. Tras este primer paso, los embriones recuperaron su volumen original y se transfirieron a dos gotas de 100 µl de solución de vitrificación (VS). Después de la incubación durante 30 s en cada gota, los embriones se cargaron en Cryotop® (KITAZATO BioPharma, Japón) y se sumergieron directamente en nitrógeno líquido.

Los Cryotops (KITAZATO BioPharma, Japón) constan de una pajuela de plástico conectada con una fina lengüeta de polipropileno (diámetro interior de 250 µm, espesor de pared de 20 µm y 3 cm de longitud) (Imagen 22 A).

MATERIAL Y MÉTODOS

Los embriones fueron cargados en aproximadamente 1 μ l de VS en la parte estrecha de la pajuela (Imagen 22 B).

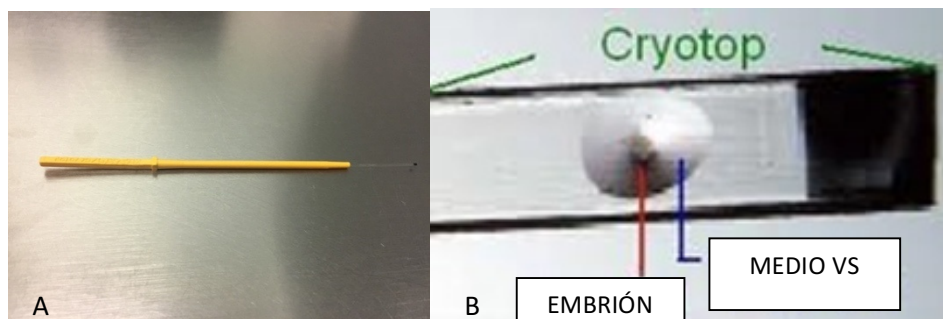


Imagen 22: A) Cryotop®. B) Detalle de la lengüeta del cryotop con un embrión cargado en medio VS.

1.4. DETECCIÓN DEL EMBARAZO

A los 14 días de la transferencia embrionaria, las pacientes se hicieron una prueba de embarazo en sangre para detectar la presencia de hCG.

La hCG es sintetizada sólo por las mujeres que están embarazadas desde que el embrión empieza a evolucionar alrededor del décimo día. El análisis de sangre para identificar la presencia de la subunidad β -hCG permite confirmar el diagnóstico de embarazo.

Los casos en los que se detectó dicha hormona se consideraron un resultado positivo (>5 UI), y comenzaron el control ecográfico gestacional en los siete días siguientes. Aquellos casos sin detección de β -hCG significó la no gestación.

Durante el control ecográfico gestacional, primero se visualizó el saco gestacional (SG) y tras dos semanas, el latido cardíaco fetal (LCF). La no visualización de SG se consideró embarazo bioquímico y la no presencia de LCF se consideró aborto.

Dicho control ecográfico se mantuvo hasta la semana 7-8 de gestación. El seguimiento de los embarazos a partir de estas semanas fue llevado a cabo por ginecólogos externos a nuestro centro, manteniendo un registro de todos los embarazos evolutivos llegados a término.

1.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante el programa informático SPSS 23.0 (Chicago, IL). Los datos se expresaron como media \pm desviación estándar o porcentajes. La significación estadística se determinó como $p < 0,05$.

El estudio estadístico llevado a cabo se compuso de tres análisis:

- Primer análisis: Se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, no siguiendo una distribución normal. Se calcularon las frecuencias para las variables categóricas y, medias, medianas y desviaciones estándar para las variables cuantitativas. Posteriormente, se estudiaron y analizaron las diferencias estadísticamente significativas en las variables mediante la prueba U de Mann-Whitney para la comparación de medias o mediante el χ^2 cuando se compararon proporciones. Se dividieron las variables de estudio en dos bloques según su importancia clínica. Todas las variables correspondientes al bloque 1 fueron consideradas y sus datos fueron mostrados independientemente de su significancia estadística. Respecto a las variables del bloque 2, solo se consideraron y mostraron aquellas que presentaron diferencias significativas en dicho análisis estadístico.
- Segundo análisis: se realizaron modelos de regresión logística binaria para ver qué variables fueron las que influían significativamente en la tasa de llegada a blastocisto y la tasa de gestación clínica. La regresión logística es un tipo de análisis de regresión utilizado para predecir el resultado de una variable categórica (en nuestro caso la llegada a blastocisto de más del 60% de los embriones y consecución de una gestación clínica) en función de variables independientes o predictoras (tales como el origen de los ovocitos, la calidad seminal, el IFE, las calidades embrionarias en día +3 y día +5 y el tipo de blastocisto formado). Este análisis permitió calcular el número de veces que la probabilidad de éxito (llegada a blastocisto o conseguir el embarazo) o de fallo (no llegada a blastocisto o no conseguir el embarazo) se multiplicó en los pacientes.
- Tercer análisis: se realizaron modelos de curvas ROC (*receiver operating characteristic curve*) para las calidades embrionarias propuestas en día +3 y +5 y se compararon entre sí para determinar cuál se ajusto mejor a la consecución de la gestación clínica. El análisis de curvas ROC es un método estadístico que determina la exactitud diagnóstica del modelo y determina el punto de corte en el que se alcanza la mayor sensibilidad y

MATERIAL Y MÉTODOS

especificidad (93). Dentro de este análisis, se combinaron también distintas variables (datos no mostrados) hasta dar con una combinación con un valor predictivo significativo.

Todos los resultados fueron calculados por transferencia realizada y siguiendo la recomendación de Zegers-Hochschild y colaboradores (94).

Las tasas se hallaron de la siguiente manera (94):

- Tasa de fecundación: se calculó considerando el número de ovocitos fecundados correctamente, respecto del total de los ovocitos microinyectados.
- Tasa de llegada a blastocisto: porcentaje entre el número de embriones en día +5 y el número de embriones en día +3.
- Tasa de implantación: calculada como la proporción entre el número de SG visualizados por ecografía y el número de transferencias realizadas.
- Tasa de gestación clínica: se calculó considerando la visualización de LCF respecto al total de transferencias realizadas.
- Tasa de gestación evolutiva: se calculó según el número de nacidos vivos respecto al total de transferencias ejecutadas.
- Tasa de aborto: se calculó teniendo en cuenta todos los SG, incluyéndose las interrupciones voluntarias del embarazo (IVE), que no llegaron a término, del total de transferencias realizadas.
- Tasa embarazo bioquímico o aborto espontáneo preclínico: se calculó considerando los embarazos diagnosticados sólo por la detección de β -hCG en suero u orina sin visualización de LCF.
- Tasa de embarazo ectópico: se consideraron los embarazos en los cuales la implantación tuvo lugar fuera de la cavidad uterina.

RESULTADOS

RESULTADOS

1.1. DESCRIPTIVOS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio comprendió a 662 pacientes y se dividieron en dos grupos de estudio según el origen de los ovocitos: donados o propios (tabla 1).

Las transferencias embrionarias pudieron ser en el mismo ciclo que la punción (día +5 postpunción) o en diferido (tras al menos una menstruación después de la punción).

Todas las pruebas estadísticas se realizaron sobre el grupo de transferencias en el mismo ciclo que la punción para evitar que la vitrificación y posterior desvitrificación pudieran influir sobre los resultados.

	RECEPCIÓN DE OVOCITOS	OVOCITOS PROPIOS
EDAD MATERNA	41,46 ± 4,02	36,38 ± 4,04
TRANSFERENCIAS EN FRESCO	307	355

Tabla 1: Población de estudio según el origen de los ovocitos.

Todos los resultados se expresaron en forma de media ± desviación estándar o de porcentaje. Las variables analizadas en este estudio se dividieron en dos bloques según su importancia clínica.

VARIABLES DEL BLOQUE 1

El primer bloque englobó el número de ovocitos microinyectados, tasa de fecundación, número de embriones en día +3, tasa de llegada a blastocisto, de gestación clínica, aborto y gestación evolutiva para cada grupo de pacientes (Tabla 2).

Estos parámetros nos dieron una idea de cómo los embriones fueron superando etapas claves en su desarrollo, primero conociendo el número de ovocitos que se microinyectaron, seguido de cuántos fecundaron en día +1 y cuántos fueron capaces de dividirse correctamente hasta día +3 y, por último, cuántos fueron capaces de activar su genoma embrionario y convertirse en blastocisto.

RESULTADOS

VARIABLES BLOQUE 1	MEDIA \pm DESVIACIÓN ESTÁNDAR/%	
	RECEPCION OVOCITARIA (N= 307)	OVOCITOS PROPIOS (N= 355)
Nº DE OVOCITOS	10,18 \pm 2,10	13,29 \pm 4,85
TASA FECUNDACIÓN	78,85%	70,51%
EMBRIONES EN DÍA +3	7,01 \pm 1,734	7,27 \pm 2,93
TASA LLEGADA A BLASTO	64,892%	60,73%
TASA GESTACIÓN CLÍNICA	49,19% (151)	39,44% (140)
TASA DE ABORTO	9,77% (30)	7,89% (28)
TASA GESTACIÓN EVOLUTIVA	39,41% (121)	31,55% (112)

Tabla 2: Descriptivos de las variables del bloque 1 en el grupo de receptoras y en el de ovocitos propios.

VARIABLES DEL BLOQUE 2

Las variables englobadas en el bloque 2 fueron las que se describieron a continuación en las tablas 3 y 4.

Se tuvo en cuenta la calidad de los embriones hasta día +5 o +6 de desarrollo y el tipo de blastocisto que formaron. Los criterios morfológicos que se siguieron para valorar y categorizar a los embriones en día +3 y +5 fueron los que dictó ASEBIR 2015 (12), tal y como hemos detallado anteriormente.

Por un lado, se cuantificó la calidad embrionaria en día +3, tanto de los embriones totales como de los que posteriormente se transfirieron en día +5 y, la calidad de todos los embriones que llegaron a día +5.

Por otro lado, se tuvo en cuenta el tipo de blastocisto que fueron capaces de formar, este parámetro nos indicó cómo de evolucionados estaban los embriones que se transfirieron o se vitrificaron, siendo el blastocisto más evolucionado el de tipo eclosión y el menos evolucionado la mórula compacta. Por último, se cuantificó también que tipo de blastocisto fue transferido (tabla 3).

Una vez transferidos los blastocistos al útero materno, se estudió cual fue el resultado del ciclo. Cabe destacar que el 1,18% de las receptoras de ovocitos y el 1,45% de las pacientes con ovocitos propios, no consiguieron blastocistos viables y su transferencia fue cancelada por este motivo, variable que se ha denominado tasa de cancelación (tabla 4).

RESULTADOS

		% (Nº EMBRIONES)	
VARIABLES BLOQUE 2		RECEPCION OVOCITARIA (N= 307)	OVOCITOS PROPIOS (N= 355)
EMB TOTALES +3	A	23,27% (501)	23,11% (596)
	B	39,99% (861)	38,85% (1002)
	C	31,26% (673)	31,64% (816)
	D	5,48% (118)	6,40% (165)
EMB TRF +3	A	30,00% (129)	34,04% (160)
	B	45,81% (197)	42,52% (199)
	C	23,35% (99)	22,55% (106)
	D	1,18% (5)	1,07% (5)
EMB TOTALES +5	A	14,07% (193)	12,12% (185)
	B	31,27% (429)	27,65% (422)
	C	54,52% (748)	59,04% (901)
	D	0,15% (2)	1,18% (18)
EMB TRF +5	A	35,35% (152)	29,15% (137)
	B	40,46% (174)	36,60% (172)
	C	23,72% (102)	30,85% (145)
	D	0,46% (2)	3,40% (16)
TIPO DE BLASTOCISTO	ECLOSIÓN	17,31% (243)	15,10% (230)
	EXPANDIDO	58,76% (825)	58,96% (898)
	BLASTOCISTO	17,45% (245)	16,09% (245)
	TEMPRANO	3,35% (47)	5,78% (88)
	CAVITANDO	2,14% (30)	2,89% (44)
	MORULA COMPACTA	0,99% (14)	1,18% (18)
TIPO DE BLASTOCISTO TRF	ECLOSIÓN	20,00% (86)	17,45% (82)
	EXPANDIDO	51,16% (220)	50,00% (235)
	BLASTOCISTO	17,44% (75)	15,11% (71)
	TEMPRANO	4,88% (21)	7,66% (36)
	CAVITANDO	4,42% (19)	5,96% (28)
	MORULA COMPACTA	2,09% (9)	3,83% (18)

Tabla 3: Descriptivos de calidad embrionaria en día +3 y +5 y tipo de blastocisto formado y transferido para cada grupo de estudio.

RESULTADOS

Cuando sí hubo transferencia y además, la prueba de embarazo en sangre (β -hCG) fue positiva, se estudió: la tasa de implantación, la tasa de gestación clínica (tabla 2), la de gestación evolutiva (tabla 2), la de bioquímico o aborto espontáneo preclínico, aborto y ectópico. Dichas tasas se han calculado según el glosario de la OMS (94) (tabla 4).

VARIABLES BLOQUE 2	RECEPCION OVOCITARIA % (Nº DE CASOS)	OVOCITOS PROPIOS % (Nº DE CASOS)
TASA DE CANCELACIÓN	1,18% (4)	1,45% (8)
TASA DE IMPLANTACIÓN	44,82% (191/430)	35,96% (169/470)
TASA DE BIOQUÍMICO	7,82% (24)	5,63% (20)
TASA DE ECTÓPICO	0,98% (3)	1,97% (7)

Tabla 4: Evolución del embarazo en ambos grupos de pacientes.

Por último, se tuvo en cuenta la calidad seminal el día que se microinyectaron los ovocitos y el IFE.

La calidad seminal se distribuyó en ambos grupos de pacientes tal y como se muestra en la tabla 5. Las calidades seminales se agruparon en cinco grupos en función de qué parámetros seminales estuvieran alterados. Los grupos de calidad seminal formados fueron los siguientes: donantes de semen (donante), normozoosperméricos (normo), no normozoosperméricos (no normo), oligo-terato-asteno-necrozoospermia (OTAN) y común teratozoospermia (común terato).

El grupo de no normozoosperméricos estuvo formado por aquellos pacientes con al menos un parámetro seminal alterado.

En el grupo OTAN, se incluyeron a los pacientes donde todos los parámetros seminales estuvieron alterados a la vez.

Por último, en el grupo común teratozoospermia, se incluyeron a los pacientes que como parámetro común alterado fue la morfología espermática. El motivo por el cual la teratozoospermia fue elegida como parámetro común, fue porque sí este parámetro estuvo alterado, la recomendación fue ir directamente a ICSI (88), por tanto, pudo ser útil su estudio a la hora de ver cómo influyó en el cultivo largo y la consecución del embarazo.

RESULTADOS

En la Tabla 5 también se mostró el IFE en cada grupo de pacientes.

GRUPOS DE CALIDAD SEMINAL	RECEPCION OVOCITARIA % (Nº DE CASOS)	OVOCITOS PROPIOS % (Nº DE CASOS)
<i>DONANTE</i>	21,82% (67)	13,52% (48)
<i>NORMO</i>	12,38% (38)	24,22% (86)
<i>NO NORMOS</i>	76,22% (234)	62,25% (221)
<i>COMUN TERATO</i>	64,82% (199)	56,06% (199)
<i>OTAN</i>	8,79% (27)	8,45% (30)
<i>IFE</i>	18,47%	17,10%

Tabla 5: Porcentaje y número de casos de las distintas calidades seminales en ambos grupos de estudio.

1.2. PRIMER ANÁLISIS: COMPARACIÓN ESTADÍSTICA DE MEDIAS Y PROPORCIONES

Los análisis estadísticos llevados a cabo en este apartado se hicieron dividiendo la población de estudio en dos grupos según el origen de los ovocitos: donados o propios. A su vez, en cada grupo, se fueron analizando los cinco grupos de calidad seminal e IFE.

OVOCITOS PROPIOS

Es universalmente conocido el efecto de la edad materna sobre la calidad ovocitaria, por tanto, dentro de este grupo de estudio las pacientes se categorizaron por su edad tal y como se muestra en la tabla 6, con el fin de estudiar cómo influyó el factor etario en las distintas variables estudiadas. Los puntos de corte fueron establecidos teniendo en cuenta que la fertilidad femenina va disminuyendo gradualmente a partir de los 30 años y, tiene su punto de inflexión después de los 35 años (63).

GRUPOS DE EDAD MATERNA: OVOCITOS PROPIOS	% (Nº DE CASOS)
<i>GRUPO 1: < 30 años</i>	8,10% (29)
<i>GRUPO 2: 30-35 años</i>	32,90% (117)
<i>GRUPO 3: 35-40 años</i>	43,80% (155)
<i>GRUPO 4: 40-45 años</i>	14,00% (50)
<i>GRUPO 5: > 45 años</i>	1,10% (4)

Tabla 6: Subgrupos de edad materna.

RESULTADOS

Los subgrupos de calidad seminal objeto de estudio se distribuyeron en los grupos de edad materna tal y como se muestra en la tabla 7.

Nº DE CASOS	EDAD MATERNA				
	GRUPO 1: < 30 años	GRUPO 2: 30-35 años	GRUPO 3: 35-40 años	GRUPO 4: 40-45 años	GRUPO 5: > 45 años
DONANTES	5	15	19	5	0*
NORMO	0*	33	37	14	2*
NO NORMO	24	69	99	27	2*
COMUN TERATO	7	30	44	12	1*
OTAN	5	12	10	2*	1*

Tabla 7: Subgrupos de calidad seminal. *No se hacen comparaciones entre estos grupos por ser la $N \leq 4$.

Posteriormente, se hicieron los análisis estadísticos combinando los grupos de calidad seminal y los de edad materna tal y como se muestran en los siguientes apartados.

Donantes de semen

Cuando se utilizó donante de semen, se observó que en las variables del bloque 1 (tabla 8):

- El nº de ovocitos fue significativamente menor a partir del grupo 3 (35-40 años).
- La tasa de fecundación del grupo 1 (<30 años) fue significativamente menor que la del grupo 4 (40-45 años).
- No hubo diferencias significativas en el número de embriones en día +3 entre los distintos grupos de edad.
- La tasa de llegada a blastocisto fue significativamente menor a partir del grupo 2 (30-35 años) ($p = 0,04$), observándose en el grupo 1 la tasa más alta.
- Aunque la tasa de aborto fue más alta en el grupo de edad 4 (40-45 años), no se observaron diferencias significativas entre los grupos de edad.
- La tasa de gestación evolutiva disminuyó significativamente a partir del grupo 4 (40-45 años). De hecho, a partir de los 40 años no se registró ningún embarazo a término.

RESULTADOS

OVOCITOS PROPIOS: DONANTE	EDAD (AÑOS)	N	MEDIA ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR/ %	P-VALOR					
				1*2	1*3	1*4	2*3	2*4	3*4
Nº DE OVOCITOS	1: <30	5	18,80 ± 6,06	NS	0,02	NS	NS	NS	NS
	2: 30-35	15	14,47 ± 5,22						
	3: 35-40	19	12,00 ± 4,83						
	4: 40-45	9	12,77 ± 3,90						
TASA FECUNDACIÓN	1: <30	5	56,86%	NS	NS	0,04	NS	NS	NS
	2: 30-35	15	71,29%						
	3: 35-40	19	73,67%						
	4: 40-45	9	72,50%						
EMBRIONES DÍA +3	1: <30	5	8,80 ± 4,32	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	2: 30-35	15	8,47 ± 3,31						
	3: 35-40	19	6,84 ± 3,15						
	4: 40-45	9	6,44 ± 2,79						
TASA LLEGADA A BLASTO	1: <30	5	71,73%	0,04	NS	NS	NS	NS	NS
	2: 30-35	15	53,07%						
	3: 35-40	19	56,26%						
	4: 40-45	9	54,97%						
TASA GESTACIÓN CLÍNICA	1: <30	5	60,00%	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	2: 30-35	15	33,33%						
	3: 35-40	19	26,32%						
	4: 40-45	9	11,11%						
TASA DE ABORTO	1: <30	5	0,00	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	2: 30-35	15	0,00						
	3: 35-40	19	0,00						
	4: 40-45	9	11,00%						
TASA GESTACIÓN EVOUTIVA	1: <30	5	60,00%	NS	NS	0,01	NS	0,01	0,02
	2: 30-35	15	33,33%						
	3: 35-40	19	26,32%						
	4: 40-45	9	0,00%						

Tabla 8: Variables del bloque cuando la calidad seminal fue de donante de semen. 1*2: comparación estadística del grupo de edad 1 frente al grupo de edad 2; 1*3: comparación estadística del grupo de edad 1 frente al grupo de edad 3. Etc. NS: no hubo diferencias significativas.

RESULTADOS

Las variables del bloque 2 solo se tuvieron en cuenta cuando se observaron diferencias significativas entre los grupos de edad materna (tabla 9):

- Se transfirieron un menor número de embriones de calidad C en el grupo 1 (< 30 años) que en el 2 (30-35 años) ($p = 0,03$).
- Cuando se tuvo en cuenta el tipo de blastocisto formado, hubo un mayor número de blastocistos de tipo expandido en el grupo 1 que en el 3 y 4 ($p = 0,01$ y $p = 0,04$). Entre los grupos 1 y 2 no hemos observado diferencias significativas, por tanto, hasta los 35 años, la media de blastocistos tipo expandido fue similar a la del grupo 1 (< 30 años).

OVOCITOS PROPIOS: DONANTE	EDAD MATERNA (AÑOS)	N	MEDIA ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR	P-VALOR				
				1*2	1*3	1*4	2*3	2*4
CALIDAD C EMB TRF +5	1: < 30	5	0,00	0,03	NS	NS	NS	NS
	2: 30-35	15	0,80 ± 0,77					
EXPANDIDO	1: < 30	5	4,20 ± 1,48	NS	0,01	0,04	NS	NS
	3: 35-40	19	1,79 ± 1,58					
	4: 40-45	9	2,00 ± 1,87					

Tabla 9: Variables del bloque 2 cuando la calidad seminal fue de donante de semen. 1*2: comparación estadística del grupo de edad 1 frente al grupo de edad 2; 1*3: comparación estadística del grupo de edad 1 frente al grupo de edad 3. Etc. NS: no hubo diferencias significativas.

Pacientes normozoospermicos

Cuando la calidad seminal fue normozoospermica, no se pudo considerar el grupo de edad 1 (< 30 años) debido al insuficiente número de pacientes con estos criterios. Este tipo de pacientes, o bien no necesitan un TRA porque han conseguido el embarazo de forma natural o bien, lo consiguen mediante una inseminación artificial. En los demás grupos de edad, en las variables del bloque 1 (tabla 10) se puede observar que:

- No hubo diferencias significativas en el número de ovocitos microinyectados, ni en la tasa de fecundación, ni en el número de embriones en día +3 entre los grupos de edad.
- La tasa de llegada a blastocisto fue significativamente mayor en el grupo 2 que en el 4.
- La tasa de gestación clínica y evolutiva fue significativamente mayor en el grupo 4 (40-45 años) que en el 3 (35-40 años).
- No se observaron diferencias significativas en la tasa de aborto.

RESULTADOS

OVOCITOS PROPIOS: NORMO	EDAD MATERNA (AÑOS)	N	MEDIA ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR	P-VALOR		
				2*3	2*4	3*4
Nº DE OVOCITOS	2: 30-35	33	14,48 ± 6,11	NS	NS	NS
	3: 35-40	37	12,40 ± 5,52			
	4: 40-45	14	12,14 ± 5,11			
TASA DE FECUNDACIÓN	2: 30-35	33	71,04%	NS	NS	NS
	3: 35-40	37	68,90%			
	4: 40-45	14	71,31%			
EMBRIONES EN DÍA +3	2: 30-35	33	7,94 ± 3,64	NS	NS	NS
	3: 35-40	37	6,70 ± 2,61			
	4: 40-45	14	6,93 ± 2,59			
TASA LLEGADA A BLASTO	2: 30-35	33	69,14%	NS	0,03	NS
	3: 35-40	37	61,58%			
	4: 40-45	14	53,33%			
TASA GESTACIÓN CLÍNICA	2: 30-35	33	39,39%	NS	NS	0,04
	3: 35-40	37	27,03%			
	4: 40-45	14	57,14%			
TASA DE ABORTO	2: 30-35	33	9,00%	NS	NS	NS
	3: 35-40	37	14,00%			
	4: 40-45	14	14,00%			
TASA GESTACIÓN EVOLUTIVA	2: 30-35	33	30,00%	NS	NS	0,02
	3: 35-40	37	13,00%			
	4: 40-45	14	43,00%			

Tabla 10: Variables del bloque 1 cuando la calidad seminal fue normozoospermica. 2*3: comparación estadística del grupo de edad 2 frente al grupo de edad 3; 2*4: comparación estadística del grupo de edad 2 frente al grupo de edad 4. Etc. NS: no hubo diferencias significativas.

RESULTADOS

Al estudiar las variables del bloque 2 (tabla 11) se pudo observar que el número de embriones de calidad B en día +5 fue mayor en el grupo 2 que en el 3 ($p = 0,02$).

OVOCITOS PROPIOS: NORMO	EDAD MATERNA (AÑOS)	N	MEDIA ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR	P-VALOR		
				2*3	2*4	3*4
CALIDAD B EMB TOTALES +5	2: 30-35	33	1,52 ± 1,30	0,02	NS	NS
	3: 35-40	37	0,89 ± 0,87			

Tabla 11: Variables del bloque 2 cuando la calidad seminal fue normozoospermica. 2*3: comparación estadística del grupo de edad 2 frente al grupo de edad 3; 2*4: comparación estadística del grupo de edad 2 frente al grupo de edad 4. Etc. NS: no hubo diferencias significativas.

Pacientes no normozoospermicos

Cuando la calidad fue no normozoospermica, es decir, cuando hubo al menos algún parámetro seminal alterado, en las variables del bloque 1 (tabla 12) se pudo observar que:

- No hubo diferencias significativas en el número de ovocitos micorinyectados, tasa de fecundación, número de embriones en día +3, tasa de llegada a blastocisto ni de aborto.
- Se observaron diferencias significativas en la tasa de gestación clínica cuando se compararon los grupos de edad 1 con los grupos 2, 3 y 4 ($p = 0,01$; $p = 0,03$; $p = 0,04$) siendo ésta mayor en el grupo 1.
- Se observaron diferencias significativas en la tasa de gestación evolutiva siendo ésta estadísticamente mayor en pacientes pertenecientes al grupo 1 (< 30 años).

Cuando se estudiaron las variables del bloque 2 (tabla 13) se observó que dentro de este grupo de pacientes:

- Hubo estadísticamente un mayor número de embriones de calidad C en los grupos 3 y 4 que en el grupo 2.
- A medida que el factor etario fue más pronunciado, hubo menos embriones en día +5 de calidad A y C y, más embriones de calidad D.
- El número de blastocistos de tipo eclosión fue significativamente mayor en el grupo 1 (< 30 años). A partir del grupo 2 (30-35 años), no se observaron diferencias a medida que la edad aumentó.
- El número de blastocistos de tipo expandido fue similar en los tres primeros grupos de edad, observándose diferencias a partir del grupo 3 (35-40 años).

RESULTADOS

OVOCITOS PROPIOS: NO NORMO	EDAD MATERNA (AÑOS)	N	MEDIA ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR	P-VALOR					
				1*2	1*3	1*4	2*3	2*4	3*4
Nº DE OVOCITOS	1: < 30	24	13,87 ± 4,01	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	2: 30-35	69	13,26 ± 4,48						
	3: 35-40	99	13,46 ± 4,48						
	4: 40-45	27	12,88 ± 4,40						
TASA DE FECUNDACIÓN	1: < 30	24	74,10%	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	2: 30-35	69	69,70%						
	3: 35-40	99	70,92%						
	4: 40-45	27	67,07%						
EMBRIONES EN DÍA +3	1: < 30	24	7,54 ± 2,57	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	2: 30-35	69	7,61 ± 2,71						
	3: 35-40	99	7,22 ± 2,85						
	4: 40-45	27	6,33 ± 2,97						
TASA LLEGADA A BLASTO	1: < 30	24	64,91%	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	2: 30-35	69	61,88%						
	3: 35-40	99	59,20%						
	4: 40-45	27	55,20%						
TASA GESTACIÓN CLÍNICA	1: < 30	24	66,67%	0,01	0,03	0,04	NS	NS	NS
	2: 30-35	69	37,68%						
	3: 35-40	99	42,42%						
	4: 40-45	27	37,04%						
TASA DE ABORTO	1: < 30	24	4,00%	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	2: 30-35	69	9,00%						
	3: 35-40	99	7,00%						
	4: 40-45	27	11,00%						
TASA GESTACIÓN EVOLUTIVA	1: < 30	24	63,00%	0,01	0,01	0,01	NS	NS	NS
	2: 30-35	69	28,00%						
	3: 35-40	99	35,00%						
	4: 40-45	27	26,00%						

Tabla 12: Variables del bloque 1 cuando la calidad seminal fue no normozoospermica.

RESULTADOS

OVOCITOS PROPIOS: NO NORMO	EDAD (AÑOS)	N	MEDIA ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR	P-VALOR					
				1*2	1*3	1*4	2*3	2*4	3*4
CALIDAD C EMB TRF +5	2: 30-35	69	0,32 ± 0,69						
	3: 35-40	99	0,35 ± 0,63	NS	NS	NS	NS	0,01	0,04
	4: 40-45	27	0,63 ± 0,74						
CALIDAD A EMB TOTALES +5	2: 30-35	69	0,58 ± 0,81						
	4: 40-45	27	0,22 ± 0,51	NS	NS	NS	NS	0,03	NS
CALIDAD C EMB TOTALES +5	1: < 30	24	2,88 ± 1,23						
	4: 40-45	27	2,04 ± 1,19	NS	NS	0,04	NS	NS	NS
CALIDAD D EMB TOTALES +5	3: 35-40	99	0,04 ± 0,20						
	4: 40-45	27	0,15 ± 0,36	NS	NS	NS	NS	NS	0,04
ECLOSION	1: < 30	24	1,21 ± 1,25						
	2: 30-35	69	0,71 ± 1,07	0,04	0,01	0,01	NS	NS	NS
	3: 35-40	99	0,56 ± 0,89						
	4: 40-45	27	0,44 ± 0,70						
EXPANDIDO	2: 30-35	69	2,78 ± 1,60						
	3: 35-40	99	2,40 ± 1,78	NS	NS	NS	NS	0,01	0,03
	4: 40-45	27	1,59 ± 1,53						

Tabla 13: Variables del bloque 2 cuando la calidad seminal fue no normozoospermica. 1*2: comparación estadística del grupo de edad 1 frente al grupo de edad 2; 1*3: comparación estadística del grupo de edad 1 frente al grupo de edad 3. Etc. NS: no hubo diferencias significativas.

Pacientes común teratozoospermicos

Cuando la calidad seminal fue de teratozoospermia, bien como único parámetro seminal alterado o bien combinado con algún otro, las variables del bloque 1 (tabla 14) fueron las siguientes:

- No se observaron diferencias significativas entre los grupos de edad ni en el número de ovocitos, ni en la tasa de fecundación, ni en el número de embriones en día +3.
- Se observaron diferencias significativas en la tasa de llegada a blastocisto cuando se compararon los grupos 1 y 4 ($p = 0,04$), es decir, a partir de los 40 años, la tasa de llegada a blastocisto fue significativamente menor.
- La tasa de gestación clínica y evolutiva fue significativamente mayor en el grupo 1 que en el 2 ($p = 0,03$).
- No se observaron diferencias significativas en la tasa de aborto.

RESULTADOS

OVOCITOS PROPIOS: COMÚN TERATO	EDAD MATERNA (AÑOS)	N	MEDIA ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR	P-VALOR					
				1*2	1*3	1*4	2*3	2*4	3*4
Nº DE OVOCITOS	1: < 30	17	14,06 ± 3,45	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	2: 30-35	51	13,27 ± 4,79						
	3: 35-40	78	13,44 ± 4,59						
	4: 40-45	22	12,95 ± 4,43						
TASA DE FECUNDACIÓN	1: < 30	17	73,90%	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	2: 30-35	51	70,46%						
	3: 35-40	78	70,94%						
	4: 40-45	22	71,09%						
EMBRIONES EN DÍA +3	1: < 30	17	7,71 ± 2,54	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	2: 30-35	51	7,59 ± 2,80						
	3: 35-40	78	7,17 ± 2,84						
	4: 40-45	22	6,45 ± 2,63						
TASA LLEGADA A BLASTO	1: < 30	17	67,66%	NS	NS	0,04	NS	NS	NS
	2: 30-35	51	61,02%						
	3: 35-40	78	60,11%						
	4: 40-45	22	55,63%						
TASA GESTACIÓN CLÍNICA	1: < 30	17	64,71%	0,03	NS	NS	NS	NS	NS
	2: 30-35	51	35,29%						
	3: 35-40	78	47,44%						
	4: 40-45	22	40,91%						
TASA DE ABORTO	1: < 30	17	6,00%	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	2: 30-35	51	6,00%						
	3: 35-40	78	8,00%						
	4: 40-45	22	9,00%						
TASA GESTACIÓN EVOLUTIVA	1: < 30	17	58,80%	0,03	NS	NS	NS	NS	NS
	2: 30-35	51	29,40%						
	3: 35-40	78	39,70%						
	4: 40-45	22	31,80%						

Tabla 14: Variables del bloque 1 cuando la calidad seminal fue común teratozoospermica. 1*2: comparación estadística del grupo de edad 1 frente al grupo de edad 2; 1*3: comparación estadística del grupo de edad 1 frente al grupo de edad 3. Etc. NS: no hubo diferencias significativas.

RESULTADOS

Cuando se estudiaron las variables del bloque 2 (tabla 15) se observó que:

- El número de embriones en día +5 con calidad B fue significativamente menor a partir del grupo 3 (35-40 años).
- El número de embriones en día +5 de calidad D fue significativamente mayor a partir del grupo de edad 4 (40-45 años).
- El número de blastocistos de tipo eclosión fue significativamente mayor en el grupo 1 (< 30 años) que en los demás grupos de edad.
- Hubo significativamente más blastocistos de tipo expandido en el grupo 2 (30-35 años) que en el 4 (40-45 años).

OVOCITOS PROPIOS: COMÚN TERATO	EDAD MATERNA (AÑOS)	N	MEDIA ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR	P-VALOR					
				1*2	1*3	1*4	2*3	2*4	3*4
CALIDAD B EMB TOTALES +5	3: 35-40	78	1,26 ± 1,07	NS	NS	NS	NS	NS	0,03
	4: 40-45	22	0,73 ± 0,88						
CALIDAD D EMB TOTALES +5	3: 35-40	17	0,00	NS	NS	NS	NS	NS	0,02
	4: 40-45	22	0,18 ± 0,39						
ECLOSION	1: < 30	17	1,29 ± 1,26	0,03	0,01	0,01	NS	NS	NS
	2: 30-35	51	0,65 ± 0,89						
	3: 35-40	78	0,53 ± 0,91						
	4: 40-45	22	0,41 ± 0,73						
EXPANDIDO	2: 30-35	51	2,75 ± 1,62	NS	NS	NS	NS	0,04	NS
	4: 40-45	22	1,86 ± 1,52						

Tabla 15: Variables del bloque 2 cuando la calidad seminal fue común teratozoospermica. 1*2: comparación estadística del grupo de edad 1 frente al grupo de edad 2; 1*3: comparación estadística del grupo de edad 1 frente al grupo de edad 3. Etc. NS: no hubo diferencias significativas.

Pacientes OTAN

Cuando la calidad seminal fue OTAN, entre las variables del bloque 1 (tabla 16) se pudo observar que:

- No hubo diferencias significativas en el número de ovocitos, tasa de fecundación, ni número de embriones en día +3.
- Se observaron diferencias significativas en la tasa de llegada a blastocisto, siendo ésta menor a partir del grupo de edad 3 (35-40 años).
- La tasa de gestación clínica disminuyó a partir del grupo de edad 3.
- No se observaron diferencias significativas en la tasa de aborto entre los grupos de edad materna.
- La tasa de gestación evolutiva fue significativamente mayor en el grupo 1 (< 30 años) que en el 3 (35-40 años) ($p = 0,04$).

En las variables englobadas en el bloque 2 (tabla 17) se observaron diferencias significativas en:

- La calidad B de los embriones totales en +5 fue significativamente mayor en el grupo 1 que en el 2 ($p = 0,04$).
- La calidad B en día +3 de los embriones que posteriormente fueron transferidos en día +5, fue mayor en el grupo 2 que en el 3 ($p = 0,03$).
- El número de blastocistos expandidos fue mayor en el grupo 2 que en el 3 ($p = 0,04$).

RESULTADOS

OVOCITOS PROPIOS: OTAN	EDAD MATERNA (AÑOS)	N	MEDIA ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR	P-VALOR		
				1*2	1*3	2*3
Nº DE OVOCITOS	1: < 30	5	14,40 ± 5,98	NS	NS	NS
	2: 30-35	12	13,25 ± 3,22			
	3: 35-40	10	14,70 ± 4,37			
TASA DE FECUNDACIÓN	1: < 30	5	74,44%	NS	NS	NS
	2: 30-35	12	73,65%			
	3: 35-40	10	72,08%			
EMBRIONES EN DÍA +3	1: < 30	5	7,60 ± 2,96	NS	NS	NS
	2: 30-35	12	8,08 ± 2,68			
	3: 35-40	10	8,30 ± 3,06			
TASA LLEGADA A BLASTO	1: < 30	5	66,54%	NS	0,02	0,03
	2: 30-35	12	64,30%			
	3: 35-40	10	45,45%			
TASA GESTACIÓN CLÍNICA	1: < 30	5	60,00%	NS	0,04	0,02
	2: 30-35	12	58,33%			
	3: 35-40	10	10,00%			
TASA DE ABORTO	1: < 30	5	0,00%	NS	NS	NS
	2: 30-35	12	17,00%			
	3: 35-40	10	0,00%			
TASA GESTACIÓN EVOLUTIVA	1: < 30	5	60,00%	NS	0,04	NS
	2: 30-35	12	41,00%			
	3: 35-40	10	10,00%			

Tabla 16: Variables del bloque 1 cuando la calidad seminal fue OTAN. 1*2: comparación estadística del grupo de edad 1 frente al grupo de edad 2; 1*3: comparación estadística del grupo de edad 1 frente al grupo de edad 3. Etc. NS: no hubo diferencias significativas.

RESULTADOS

OVOCITOS PROPIOS: OTAN	EDAD MATERNA (AÑOS)	N	MEDIA ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR	P-VALOR
CALIDAD B EMB TOTALES +5	1: < 30	5	2,20 ± 1,48	0,04
	2: 30-35	12	1,08 ± 0,99	
CALIDAD B EMB TRF +3	2: 30-35	12	0,83 ± 0,72	0,03
	3: 35-40	10	0,20 ± 0,42	
EXPANDIDO	2: 30-35	12	3,08 ± 1,73	0,04
	3: 35-40	10	1,90 ± 2,33	

Tabla 17: Variables del bloque 2 cuando la calidad seminal fue OTAN.

RECEPCIÓN DE OVOCITOS

En este grupo de pacientes la edad materna no fue tan importante como en el grupo de ovocitos propios. Las receptoras de ovocitos siempre recibieron óvulos de mujeres menores de 35 años, eliminando así el factor etario. Por tanto, este grupo de pacientes fue ideal para estudiar la influencia del espermatozoide en el embrión y ver qué calidades seminales fueron las más determinantes en la formación de los blastocistos, fase embrionaria en la que el embrión se activó y manifestó su genoma masculino.

En este grupo de estudio se compararon las variables del bloque 1 entre los cinco grupos de calidad seminal. Cuando se analizaron dichas variables, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos de calidad seminal en ninguna de las variables estudiadas (tabla 18).

Sin embargo, cuando se analizaron las variables del bloque 2 (Tabla 19) se observó que:

- Hubo estadísticamente un mayor número de embriones de tipo blastocistos en el grupo de normozoospermicos y donantes de semen que en las demás calidades seminales. De igual manera se pudo observar en el grupo de no común teratozoospermia al compararlo con las demás calidades.
- Hubo significativamente más embriones de tipo temprano en el grupo común teratozoospermia.

RESULTADOS

RECEPTORAS DE OVOCITOS: VARIABLES BLOQUE 1	N	Nº DE OVOCITOS	TASA DE FECUNDACIÓN	EMBRIONES EN DÍA +3	TASA LLEGADA A BLASTO	TASA GESTACIÓN CLÍNICA	TASA ABORTO	TASA GESTACIÓN EVOLUTIVA
NO DONANTES	25	10,23 ±	78,56 ± 14,79	6,98 ± 1,85	65,04 ± 20,51	50,00%	9,00%	38,20%
DONANTES	57	9,67 ± 2,09	79,50 ± 12,47	6,54 ± 1,77	64,29 ± 25,02	45,61%	12,00%	29,90%
P-VALOR		0,15	0,47	0,08	0,32	0,55	0,48	0,30
NO NORMO	27	10,08 ±	79,14 ± 14,27	6,874 ± 1,87	65,12 ± 21,45	50,18%	10,00%	37,50%
NORMO	34	10,45 ±	75,63 ± 14,81	7,05 ± 1,61	63,12 ± 21,60	41,18%	9,00%	28,90%
P-VALOR		0,48	0,16	0,62	0,48	0,32	0,84	0,37
NORMO Y	91	9,95 ± 2,08	78,10 ± 13,42	6,72 ± 1,72	63,87 ± 23,74	43,96%	11,00%	29,50%
NO NORMO	21	10,19 ±	79,03 ± 14,77	6,97 ± 1,89	65,35 ± 20,36	51,39%	9,00%	39,70%
P-VALOR		0,46	0,12	0,25	0,73	0,23	0,64	0,13
NO COMÚN TERATO	12	9,96 ± 1,97	78,73 ± 13,50	6,74 ± 1,68	64,05 ± 23,07	44,72%	10,00%	31,20%
COMÚN TERATO	18	10,23 ±	78,75 ± 14,94	7,00 ± 1,95	65,47 ± 20,29	51,17%	10,00%	40,30%
P-VALOR		0,46	0,55	0,19	0,84	0,20	0,99	0,19
NO OTAN	28	10,09 ±	78,73 ± 14,19	6,91 ± 1,85	64,75 ± 21,63	49,47%	10,00%	36,50%
OTAN	26	10,33 ±	78,86 ± 16,42	6,70 ± 1,77	66,49 ± 19,38	46,15%	8,00%	37,00%
P-VALOR		0,75	0,68	0,42	0,66	0,75	0,71	0,92

Tabla 18: Variables del bloque 1 en cada grupo de calidad seminal cuando las pacientes fueron receptoras de ovocitos. NS: no hubo diferencias significativas.

RESULTADOS

RECEPTORAS DE OVOCITOS: VARIABLES BLOQUE 2	GRUPOS	N	MEDIA ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR	P-VALOR
BLASTO	NORMO Y DONANTES	105	0,93 ± 1,08	0,01
	NO NORMO	234	0,68 ± 0,92	
	NO COMUN TERATO	138	0,90 ± 1,04	0,01
	COMUN TERATO	201	0,66 ± 0,93	
TEMPRANO	NO DONANTES	272	0,17 ± 0,50	0,02
	DONANTES	67	0,09 ± 0,34	
	NORMO Y DONANTE	105	0,09 ± 0,32	0,04
	NO NORMO	234	0,18 ± 0,52	
	NO COMUN TERATO	138	0,09 ± 0,32	0,01
	COMUN TERATO	201	0,20 ± 0,55	

Tabla 19: Variables del bloque 2 en cada grupo de calidad seminal cuando las pacientes fueron receptoras de ovocitos.

FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO (IFE)

Cuando se tuvo en cuenta el IFE, en primer lugar se analizó para los cinco grupos de calidad seminal independientemente del origen de los ovocitos.

En este caso el IFE se agrupó en dos o tres categorías. El grupo de fragmentación en dos categorías incluyó aquellas fragmentaciones que se consideraron normales y, las que se consideraron alteradas. Cuando se agrupó en tres categorías, se hizo un grupo de fragmentaciones con IFE <13%, otro con un IFE entre el 13-27% y, el tercer grupo con IFE ≥27% (tablas 20 y 21).

De tal manera que, cuando el IFE se dividió en dos grupos, hubo significativamente más pacientes normozoopérmicos con un IFE normal (<27%) que alterado (≥27%). Sin embargo, hubo más pacientes OTAN con un IFE alterado (≥27%) que normal (tabla 20). En los pacientes no normozoospermicos y aquellos donde tuvieron en común la teratozoospermia, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras con IFE normal y alterado.

RESULTADOS

2 CATEGORIAS	IFE	N	MEDIA ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR	P-VALOR
NORMO	<27%	166	0,25 ± 0,43	0,01
	≥27%	28	0,05 ± 0,23	
NO NORMOS	<27%	166	0,73 ± 0,44	NS
	≥27%	28	0,87 ± 0,34	
COMUN TERATO	<27%	166	0,38 ± 0,49	0,01
	≥27%	28	0,64 ± 0,49	
OTAN	<27%	166	0,07 ± 0,25	0,00
	≥27%	28	0,36 ± 0,49	

Tabla 20: Calidades seminales en función del IFE normal o alterado. NS: no hubo diferencias significativas.

Cuando la división se hizo en 3 categorías (tabla 21), se observó que hubo significativamente más pacientes normozoospermicos con IFE <13% que cuando el IFE fue de 13-27% o ≥27%. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas cuando se compararon los grupos de IFE del 13-27% y ≥27%, es decir, hubo un número similar de pacientes normozoospermicos con IFE entre 13-27% y ≥27%.

Por último, cuando los pacientes fueron no normozoospermicos, se observó un menor número de casos cuando el IFE <13% que de 13-27%. Cuando los pacientes tuvieron como parámetro alterado común la teratozoospermia, se observaron menos pacientes con IFE <13% que del 13-27% y ≥27%.

TRES CATEGORIAS	IFE	N	MEDIA ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR	P-VALOR		
				1*2	1*3	2*3
NORMO	1: <13%	64	0,36 ± 0,48	0,02	0,01	0,70
	2: 13-27%	63	0,17 ± 0,38			
	3: ≥27%	39	0,20 ± 0,40			
NO NORMOS	1: <13%	64	0,64 ± 0,48	0,03	0,17	0,63
	2: 13-27%	63	0,80 ± 0,40			
	3: ≥27%	39	0,78 ± 0,41			
COMUN TERATO	1: <13%	64	0,31 ± 0,47	0,04	0,02	0,67
	2: 13-27%	63	0,46 ± 0,50			
	3: ≥27%	39	0,55 ± 0,50			
OTAN	1: <13%	64	0,04 ± 0,21	0,24	0,14	0,69
	2: 13-27%	63	0,08 ± 0,27			
	3: ≥27%	39	0,14 ± 0,35			

Tabla 21: Calidades seminales en función del IFE dividido en tres categorías. 1*2: comparación estadística del grupo 1 frente al grupo 2; 1*3: comparación estadística del grupo 1 frente al grupo 3. Etc. NS: no hubo diferencias significativas.

RESULTADOS

En los pacientes OTAN, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio, aunque la media de estos pacientes fue más alta en el grupo con IFE $\geq 27\%$, pudiéndose observar de esta manera, una tendencia de este tipo de muestras hacia un IFE alterado (tabla 21).

En segundo lugar, también se estudió el IFE teniendo en cuenta el origen de los ovocitos. El objetivo fue estudiar cómo este parámetro seminal (IFE) pudo influir en el desarrollo del embrión hasta blastocisto.

El grupo de pacientes con ovocitos propios se dividió en dos categorías en función de la edad materna: pacientes < 35 años y ≥ 35 años. Se estableció este punto de corte porque fue la edad a partir de la cual la calidad ovocitaria empezó a decrecer (63). El IFE también se dividió en dos grupos, IFE $< 27\%$ (normal) e IFE $\geq 27\%$ (alterado).

Por tanto, en las variables del bloque 1, la comparación estadística se hizo en dos pasos:

- a) Tener o no el IFE normal dentro de las pacientes menores de 35 años y dentro de las mayores de 35 años:

Cuando el IFE $< 27\%$, no se observaron diferencias significativas entre ser mayor o menor de 35 años en ninguna variable estudiada (tabla 22). Sin embargo, cuando el IFE $\geq 27\%$, sí se observaron diferencias significativas entre ser mayor o menor de 35 años en el número de ovocitos microinyectados.

- b) Ser o no mayor de 35 años cuando se tuvo el IFE normal o cuando el IFE fue alterado:

Cuando la comparación se hizo entre las pacientes menores de 35 años, se observaron diferencias significativas en la tasa de gestación clínica, siendo ésta mayor en el grupo con IFE alterado. En las pacientes mayores de 35 años, se observaron diferencias significativas en:

- El número de ovocitos microinyectados, siendo éste mayor en el grupo con IFE alterado.
- El número de embriones en día +3, siendo éste mayor en el grupo con IFE alterado.

En ninguna de las variables del bloque 2 se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de IFE (datos no mostrados).

RESULTADOS

OVOCITOS PROPIOS: VARIABLES BLOQUE 1	EDAD MATERNA	N	IFE < 27%		P-VALOR	P-VALOR		N	IFE ≥ 27%		P-VALOR
			MEDIA ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR			IFE <27% VS ≥27%	MEDIA ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR				
Nº DE OVOCITOS	< 35 años	36	13,28 ± 4,26		0,23	NS	10	12,80 ± 3,36			
	≥ 35 años	69	12,36 ± 4,80			0,01	8	16,37 ± 2,61			0,03
TASA FECUNDACIÓN	< 35 años	36	68,07 ± 16,42		0,54	NS	10	69,97 ± 19,21			0,62
	≥ 35 años	69	70,44 ± 16,57			NS	8	74,12 ± 9,89			
EMBRIONES DÍA +3	< 35 años	36	6,53 ± 2,59		0,41	NS	10	7,60 ± 2,76			0,19
	≥ 35 años	69	6,12 ± 2,63			0,01	8	9,25 ± 1,98			
TASA LLEGADA A BLASTO	< 35 años	36	63,21%		0,23	NS	10	58,11%			0,18
	≥ 35 años	69	58,77%			NS	8	45,69%			
TASA GESTACIÓN CLÍNICA	< 35 años	36	25,00%		0,19	0,03	10	60,00%			0,36
	≥ 35 años	69	37,68%			NS	8	37,50%			
TASA DE ABORTO	< 35 años	36	5,60%		0,43	NS	10	20,00%			0,19
	≥ 35 años	69	10,10%			NS	8	0,00			
TASA GESTACIÓN EVOLUTIVA	< 35 años	36	16,70%		0,22	NS	10	40,00%			0,92
	≥ 35 años	69	27,50%			NS	8	37,50%			

Tabla 22: Distribución del IFE en las variables de estudio del bloque 1, que a su vez, están también divididos en dos subgrupos de edad materna para las pacientes con ovocitos propios. NS: no hubo diferencias significativas

RESULTADOS

De la misma manera, se comparó el IFE en el grupo de receptoras de ovocitos. En este grupo, se eliminó el factor ovocitario para ver cómo influyó realmente la fragmentación del ADN espermático en la formación del blastocisto y en la consecución del embarazo.

Según la tabla 23 en la que se analizó el IFE normal (IFE <27%) y alterado (IFE ≥27%) en las variables del bloque 1, se pudieron observar diferencias significativas en la tasa de gestación clínica, siendo ésta superior en el grupo de IFE normal. En la tasa de gestación evolutiva, aunque no hubo diferencias significativas, sí se pudo observar una tendencia a favor del IFE normal.

RECEPTORAS DE OVOCITOS: VARIABLES BLOQUE 1	IFE	N	MEDIA ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR	P-VALOR
Nº DE OVOCITOS	< 27%	70	10,07 ± 2,10	0,20
	≥ 27%	13	9,77 ± 2,83	
TASA DE FECUNDACIÓN	< 27%	70	78,19%	0,97
	≥ 27%	13	76,87%	
EMBRIONES DÍA +3	< 27%	70	6,80 ± 2,25	0,56
	≥ 27%	13	6,61 ± 1,76	
TASA LLEGADA A BLASTO	< 27%	70	63,47%	0,77
	≥ 27%	13	58,97%	
TASA GESTACIÓN CLÍNICA	< 27%	70	54,00%	0,04
	≥ 27%	13	20,00%	
TASA DE ABORTO	< 27%	70	14,00%	0,72
	≥ 27%	13	10,00%	
TASA GESTACIÓN EVOLUTIVA	< 27%	70	40,00%	0,07
	≥ 27%	13	10,00%	

Tabla 23: Distribución del IFE normal y alterado en el grupo receptoras de ovocitos.

Cuando se estudiaron las variables del bloque 2 (tabla 24) en este grupo de pacientes, se pudo observar que hubo significativamente más embriones de tipo eclosión cuando el IFE fue normal que alterado. Sin embargo, hubo significativamente menos embriones transferidos de tipo cavitando cuando el IFE fue normal.

RESULTADOS

RECEPTORAS DE OVOCITOS: VARIABLES BLOQUE 2	IFE	N	MEDIA ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR	P-VALOR
ECLOSION	< 27%	70	0,71 ± 0,84	0,01
	≥ 27%	13	0,15 ± 0,55	
EMB TRF: CAVITANDO	< 27%	70	0,00	0,01
	≥ 27%	13	0,10 ± 0,32	

Tabla 24: Variables de estudio del bloque 2 con significancia estadística cuando el IFE estuvo dividido en dos grupos (normal vs no normal) en el grupo de receptoras de ovocitos.

1.3. SEGUNDO ANALISIS: REGRESIONES LOGISTICAS BINARIAS

En este apartado se usó la regresión logística binaria para relacionar el origen de los ovocitos, la calidad seminal, el IFE y las calidades embrionarias en día +3 y +5 (considerados como covariables) con la tasa de llegada a blastocisto y la de gestación clínica (consideradas como variables dependientes), evaluando así, el valor predictivo de las covariables en cuestión y validando el primer análisis estadístico anteriormente realizado.

Por tanto, se realizaron dos modelos distintos donde las variables dependientes para cada modelo fueron:

- La tasa de llegada a blastocisto, la cual tomó valor de "1" cuando la tasa fue superior al 60 % y de "0" cuando la tasa fue inferior a 60%. Se eligió dicho punto de corte teniendo en cuenta la tabla 2, donde al menos el 60% de los embriones llegaron a blastocisto en ambos grupos de estudio.
- La tasa de gestación clínica, donde la presencia de al menos un SG tomó valor de "1" (blastocisto implantado), o valor de "0", ningún SG (blastocisto no implantado).

Y las covariables objeto de estudio fueron:

- Covariable 1: origen de los ovocitos (ovocitos donados y propios).
- Covariables 2 y 3: calidad seminal e IFE.
- Covariable 4: calidad embrionaria en día +3 y +5.

COVARIABLE 1: ORIGEN DE LOS OVOCITOS

Cuando se realizaron los modelos de regresión logística binaria y se tomó como covariable el origen de los ovocitos, éstos pudieron ser donados o propios y, se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 25.

El grupo de receptoras de ovocitos se vio beneficiado estadísticamente tanto en la llegada de al menos el 60% de los embriones a blastocistos como en la consecución de la gestación clínica. Mientras que, el grupo de ovocitos propios se vio negativamente afectado para ambas variables dependientes.

ORIGEN DE LOS OVOCITOS	VARIABLE DEPENDIENTE: TASA DE AL MENOS UN 60 % DE LLEGADA A BLASTOCISTO				VARIABLE DEPENDIENTE: GESTACIÓN CLÍNICA			
	P-VALOR	ODDS RATIO	95% C.I. para ODDS RATIO		P-VALOR	ODDS RATIO	95% C.I. para ODDS RATIO	
			Inf.	Sup.			Inf.	Sup.
RECEPTORAS DE OVOCITOS	<0,01	1,61	1,18	2,20	0,01	1,49	1,09	2,02
OVOCITOS PROPIOS	<0,01	0,62	0,45	0,84	0,01	0,67	0,49	0,92

Tabla 25: Regresión logística binaria según el origen de los ovocitos para la tasa de llegada a blastocisto y la gestación clínica.

Se quiso profundizar el estudio en el grupo de pacientes con ovocitos propios, por ello, se calcularon modelos regresión para las pacientes menores de 30 y 35 años (tabla 26).

Cuando lo que se tuvo en cuenta fue la llegada a blastocisto se observó que en pacientes menores de 30 años, la probabilidad de conseguir más del 60% de blastocistos fue más de dos veces superior a probabilidad que tienen las mayores de dicha edad y, la probabilidad de conseguir una gestación clínica fue tres veces superior.

Cuando el punto de corte se estableció en los 35 años, estas pacientes tuvieron casi dos veces más probabilidad de que al menos el 60% de sus embriones llegasen a blastocistos (tabla 26). Sin embargo, este grupo de pacientes, ya no tuvieron un valor predictivo en la consecución de la gestación clínica (tabla 26).

RESULTADOS

OVOCITOS PROPIOS	VARIABLE DEPENDIENTE: TASA DE AL MENOS UN 60 % DE LLEGADA A BLASTOCISTO				VARIABLE DEPENDIENTE: GESTACIÓN CLÍNICA			
	P-VALOR	ODDS RATIO	95% C.I. para ODDS RATIO		P-VALOR	ODDS RATIO	95% C.I. para ODDS RATIO	
			Inf.	Sup.			Inf.	Sup.
<30 AÑOS	0,04	2,31	1,04	5,13	<0,01	3,22	1,45	7,15
<35 AÑOS	0,02	1,70	1,08	2,67	NS	-	-	-

Tabla 26: Regresión logística binaria según la edad materna para la gestación clínica.

COVARIABLES 2 Y 3: CALIDAD SEMINAL E IFE

La calidad seminal y el IFE se analizaron mediante modelos de regresión logística binarios para ambas variables dependientes tanto en el grupo de pacientes receptoras de ovocitos como con ovocitos propios.

En las receptoras de ovocitos, ninguna de las calidades seminales estudiadas tuvo un valor pronóstico o predictivo en la tasa de llegada a blastocisto o de gestación evolutiva (tabla 27). Del mismo modo, tampoco el IFE tuvo valor predictivo para ninguna de las variables dependientes estudiadas.

RECEPTORAS DE OVOCITOS	VARIABLE DEPENDIENTE: TASA DE AL MENOS UN 60 % DE LLEGADA A BLASTOCISTO				VARIABLE DEPENDIENTE: GESTACIÓN CLÍNICA			
	P-VALOR	ODDS RATIO	95% C.I. para ODDS RATIO		P-VALOR	ODDS RATIO	95% C.I. para ODDS RATIO	
			Inf.	Sup.			Inf.	Sup.
DONANTE	0,64	0,87	0,48	1,56	0,55	0,84	0,47	1,49
NORMO	0,73	1,13	0,55	2,33	0,32	1,44	0,70	2,96
NO NORMO	0,87	1,04	0,63	1,72	0,23	0,74	0,45	1,21
COMUN TERATO	0,62	0,89	0,56	1,41	0,20	0,74	0,47	1,17
OTAN	0,46	0,73	0,31	1,70	0,75	1,14	0,51	2,56
IFE	0,35	0,50	0,12	2,12	0,06	4,69	0,92	23,86

Tabla 27: Valor predictivo de la calidad seminal e IFE en la tasa de llegada a blastocisto y gestación clínica en el grupo de receptoras de ovocitos.

En el grupo de pacientes con ovocitos propios, el factor etario una vez más, fue un criterio de división, estableciéndose dos grupos de edad materna: <35 años y >35 años.

Cuando se tuvo en cuenta la tasa de llegada a blastocisto, en las pacientes menores de 35 años, se observó que la calidad seminal normozoospermica, aumentó hasta tres veces la tasa

RESULTADOS

de llegada blastocisto de al menos el 60% de los embriones. Sin embargo, ninguna calidad seminal se asoció con la consecución de la gestación clínica. Del mismo modo, el IFE tampoco se asoció con las variables dependientes estudiadas (tabla 28).

OVOCITOS PROPIOS: <35 AÑOS	VARIABLE DEPENDIENTE: TASA DE AL MENOS UN 60 % DE LLEGADA A BLASTOCISTO				VARIABLE DEPENDIENTE: GESTACIÓN CLÍNICA			
	P-VALOR	ODDS RATIO	95% C.I. para ODDS RATIO		P-VALOR	ODDS RATIO	95% C.I. para ODDS RATIO	
			Inf.	Sup.			Inf.	Sup.
DONANTE	0,46	0,70	0,27	1,80	0,76	0,86	0,33	2,25
NORMO	0,01	3,02	1,29	7,07	0,62	0,82	0,37	1,80
NO NORMO	0,08	0,54	0,27	1,08	0,52	1,25	0,63	2,49
COMUN TERATO	0,11	1,72	0,89	3,31	0,91	0,96	0,50	1,857
OTAN	0,30	1,75	0,61	5,02	0,17	2,05	0,73	5,72
IFE	0,48	1,68	0,40	6,97	0,05	0,22	0,05	0,97

Tabla 28: Valor predictivo de la calidad seminal y el IFE en la tasa de llegada a blastocisto y la gestación clínica en el grupo de pacientes menores de 35 años con ovocitos propios.

En las pacientes mayores de 35 años, se observó que ni la calidad seminal ni el IFE se asociaron de forma significativa con las variables dependientes (tabla 29).

OVOCITOS PROPIOS: >35 AÑOS	VARIABLE DEPENDIENTE: TASA DE AL MENOS UN 60 % DE LLEGADA A BLASTOCISTO				VARIABLE DEPENDIENTE: GESTACIÓN CLÍNICA			
	P-VALOR	ODDS RATIO	95% C.I. para ODDS RATIO		P-VALOR	ODDS RATIO	95% C.I. para ODDS RATIO	
			Inf.	Sup.			Inf.	Sup.
DONANTE	0,23	0,60	0,23	1,39	0,08	0,42	0,16	1,09
NORMO	0,43	1,28	0,69	2,40	0,86	0,94	0,49	1,81
NO NORMO	0,89	1,04	0,59	1,83	0,15	1,53	0,85	2,76
COMUN TERATO	0,58	0,86	0,49	1,48	0,10	2,08	1,17	3,68
OTAN	0,15	0,38	0,10	1,44	0,12	0,29	0,06	1,36
IFE	0,19	4,23	0,49	36,38	0,99	1,01	0,22	4,57

Tabla 29: Valor predictivo de la calidad seminal y el IFE en la tasa de llegada a blastocisto y gestación clínica en el grupo de pacientes mayores de 35 años con ovocitos propios.

COVARIABLE 4: CALIDADES EMBRIONARIAS EN DÍA +3 Y +5

La decisión de realizar un cultivo largo o no, muchas veces se tomó en función del número y calidad de los embriones en día +3. Por ello, se quisieron comparar estadísticamente las calidades en día +3 y +5 de los embriones que se transfirieron. Según la tabla 30, se pudo observar la probabilidad que un mismo embrión en día +3 y +5 tenga la misma categoría.

Además, se comparó estadísticamente la media de embriones de calidad A en día +3 y +5. La misma comparación se hizo para las tres calidades restantes, no observándose diferencias significativas en el grupo de receptoras de ovocitos. Es decir, en día +3 y +5 tuvieron medias de embriones similares para una misma categoría. No pasó lo mismo cuando se analizaron dichas diferencias en el grupo de pacientes con ovocitos propios, donde se encontraron diferencias significativas en los embriones de calidad D ($p=0,01$). Por tanto, la media de embriones de calidad D fue estadísticamente distinta en día +3 y día +5. Para el resto de calidades fue muy similar.

% (Nº EMB +5/Nº EMB +3)

EMBRIONES DE TRF	RECEPTORAS DE OVOCITOS	P-VALOR	OVOCITOS PROPIOS	P-VALOR
CALIDAD A DIA +5	40,15% (55/137)	0,18	35,85% (57/159)	0,19
CALIDAD B DIA +5	50,49% (102/202)	0,09	41,71% (83/199)	0,19
CALIDAD C DIA +5	46,08% (47/102)	1,00	51,43% (54/105)	0,08
CALIDAD D DIA +5	0,00% (0/5)	0,25	20,00% (1/5)	0,01

Tabla 30: Porcentaje de embriones con las mismas categorías en día +3 y +5 para cada grupo de estudio.

La importancia en la decisión de llevar o no un ciclo a cultivo largo en función de estas calidades, nos llevó a plantearnos qué valor predictivo realmente tuvieron las calidades propuestas en día +3 y, si es mayor o menor que las propuestas día +5. Para ello, en el análisis se incluyeron también aquellas variables pertenecientes al bloque 2 que se creyeron determinantes a la hora de formar un blastocisto o conseguir una gestación clínica (tipo de blastocisto formado y transferido).

De este modo, las covariables binarias objeto de estudio se sometieron una a una al análisis de regresión, aquellas con $p \geq 0,05$ no se consideraron en el modelo final.

RESULTADOS

El modelo de regresión logística se llevo a cabo en ambos grupos de pacientes: receptoras de ovocitos y las pacientes con ovocitos propios.

Se comenzó el análisis con el grupo de receptoras de ovocitos (tabla 31), donde se observó una asociación estadística entre la gestación clínica y la calidad A y B de los embriones totales en día +5, siendo más de dos veces superior la probabilidad de conseguir una gestación clínica cuando se tuvieron embriones de calidad B y, casi dos veces superior cuando se tuvieron embriones de calidad A. Además, si el embrión transferido fue calidad A, la gestación clínica fue casi dos veces superior. Sin embargo, cuando se tuvieron blastocistos de tipo temprano y mórula compacta, la gestación clínica se redujo a menos de la mitad que cuando no se tuvieron, afectando negativamente a la variable dependiente. Lo mismo pasó cuando el tipo de embrión transferido fue un temprano (tabla 31).

RECEPTORAS DE OVOCITOS: GESTACIÓN CLÍNICA	P- VALOR	ODDS RATIO	95% C.I. para ODDS RATIO	
			Inf.	Sup.
CALIDAD A EMB TOTALES +5	0,01	1,75	1,11	2,76
CALIDAD B EMB TOTALES +5	0,01	2,09	1,17	3,72
TEMPRANO	0,02	0,43	0,21	0,89
MÓRULA COMPACTA	0,04	0,11	0,01	0,87
CALIDAD A EMB TRF +5	0,01	1,75	1,11	2,76
EMB TRF TEMPRANO	0,00	0,10	0,02	0,45

Tabla 31: Valor predictivo de las covariables en las receptoras de ovocitos para la consecución de la gestación clínica.

Cuando se tuvo en cuenta que al menos un 60% del embriones llegaran a blastocisto, se observó que, por un lado los embriones de calidad D en día +3, afectaron negativamente a la llegada a blastocisto y, por el otro, los embriones que en día +3 se categorizaron de calidad B y posteriormente, en día +5 se transfirieron, afectaron positivamente a la llegada a blastocisto (tabla 32).

RECEPTORAS DE OVOCITOS: TASA DE AL MENOS UN 60 % DE LLEGADA A BLASTOCISTO	P-VALOR	ODDS RATIO	95% C.I. para ODDS RATIO	
			Inf.	Sup.
CALIDAD D EMB TOTALES +3	0,01	0,53	0,32	0,87
CALIDAD B EMB TRF +3	0,03	1,65	1,04	2,61

Tabla 32: Valor predictivo de las covariables en las receptoras de ovocitos para la tasa de llegada a blastocisto.

Por tanto, las variables mostradas en las tablas 31 y 32 fueron las que tuvieron un valor predictivo sobre las dos variables dependientes en el grupo de pacientes receptoras de ovocitos.

RESULTADOS

En el grupo de pacientes con ovocitos propios, el modelo de regresión logística se realizó en dos grupos de edad materna, las menores de 35 años y las mayores 35.

Cuando las pacientes tuvieron menos de 35 años, que tuvieran embriones de calidad C en día +3 aumento casi cinco veces la consecución de la gestación clínica.

OVOCITOS PROPIOS < 35 AÑOS: GESTACIÓN CLÍNICA	P-VALOR	ODDS RATIO	95% C.I. para ODDS RATIO	
			Inf.	Sup.
CALIDAD C EMB TOTALES +3	0,02	4,78	1,33	17,20

Tabla 33: Valor predictivo de la covariable en las pacientes menores de 35 años con ovocitos propios para la consecución de la gestación clínica.

De esta regresión logística binaria se pudo obtener la siguiente fórmula para hallar la probabilidad de tener una gestación clínica cuando se tuvo en cuenta tener embriones de calidad C en día +3 de desarrollo.

$$P = 1 / (1 + e^{(1,67 - 1,56 * \text{EMB CAL C})})$$

Cuando las pacientes tuvieron más de 35 años, tener embriones de calidad B en día +3 significó el aumento en más de seis veces de la consecución de la gestación clínica. Lo mismo ocurrió cuando tuvieron embriones de calidad A en día +5, aumentando más de tres veces la probabilidad de gestación clínica. Si además, los embriones de calidad A fueron los que se transfirieron, la probabilidad de gestación también se vio aumentada en más de tres veces. Por el contrario, cuando se tuvieron embriones de calidad C en día +5, éstos influyeron negativamente en la gestación clínica disminuyéndolo a menos de la mitad (tabla 34).

OVOCITOS PROPIOS > 35 AÑOS: GESTACIÓN CLÍNICA	P- VALOR	ODDS RATIO	95% C.I. para ODDS RATIO	
			Inf.	Sup.
CALIDAD B EMB TOTALES +3	0,01	6,70	1,52	29,50
CALIDAD A EMB TOTALES +5	0,00	3,46	1,88	6,35
CALIDAD C EMB TOTALES +5	0,02	0,32	0,12	0,81
CALIDAD A EMB TRF +5	0,00	3,47	1,88	6,35
CALIDAD C EMB TRF +5	0,01	0,46	0,25	0,85

Tabla 34: Valor predictivo de las covariables en las pacientes mayores de 35 años con ovocitos propios para la consecución de la gestación clínica.

RESULTADOS

Por último, cuando se tuvieron embriones de calidad D en día +3, éstos influyeron negativamente en la tasa de llegada a blastocisto, reduciéndolo a menos de la mitad que si se tuvieran embriones de otra calidad (tabla 35).

OVOCITOS PROPIOS > 35 AÑOS: TASA DE AL MENOS UN 60 % DE LLEGADA A BLASTOCISTO	P-VALOR	ODDS RATIO	95% C.I. para ODDS RATIO	
			Inf.	Sup.
CALIDAD D EMB TOTALES +3	<0,01	0,38	0,20	0,72

Tabla 35: Valor predictivo de la covariable en las pacientes mayores de 35 años con ovocitos propios para la tasa de llegada a blastocisto.

1.4. TERCER ANÁLISIS: CURVAS ROC

Como ya se ha mencionado anteriormente, en muchos casos, la decisión de llevar o no un ciclo a cultivo largo fue tomada en función del número y calidad de los embriones en día +3. Por este motivo, se representaron mediante curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) las calidades embrionarias en día +3 *versus* las calidades embrionarias en día +5, lo que permitió analizar que calidades fueron las que más se ajustaron al objetivo final de un TRA, conseguir una gestación.

Del mismo modo, se hicieron distintas combinaciones de variables para estudiar cuales fueron las que tuvieron mayor valor predictivo.

CALIDADES EMBRIONARIAS EN DÍA +3 *VERSUS* DÍA +5

En nuestro caso, las curvas ROC cuantificaron la capacidad de un indicador diagnóstico (calidades en día +3 y +5) para discriminar entre pacientes que han conseguido el embarazo y los que no lo hicieron, de tal manera que, nos permitieron valorar la capacidad de clasificación de los modelos y compararlos entre sí. El modelo tendrá más capacidad de clasificación cuanto mayor sea el área bajo la curva.

El área bajo la curva ROC equivale a la probabilidad de que, si se eligiesen al azar a 2 parejas, una embarazada y otra no, el modelo los clasificase a ambos correctamente. Por lo tanto, estima la capacidad que tiene un modelo de distinguir o “clasificar” entre parejas embarazadas y no.

Los modelos fueron calculados con las calidades embrionarias en día +3 y +5 para ambos grupos de pacientes: receptoras de ovocitos y ovocitos propios.

Receptoras de ovocitos

En este grupo de pacientes, ninguna calidad propuesta en día +3 nos dio un valor predictivo significativo para la consecución del embarazo. Sin embargo, cuando se propusieron calidades A y B en día +5, éstas si tuvieron valor predictivo para conseguir dicho fin (tabla 36).

El área bajo la curva para las dos calidades fue muy parecido (calidad A=0,56; calidad B=0,57), aunque cuando se propusieron embriones de calidad A, la sensibilidad fue de un 53% y la especificidad del 39% y, cuando la calidad fue B, la sensibilidad fue del 85% y una especificidad del 73% (figura 3).

Por tanto, las calidades embrionarias con mayor valor predictivo y mayor área bajo la curva ROC fueron la A y B propuestas en día +5.

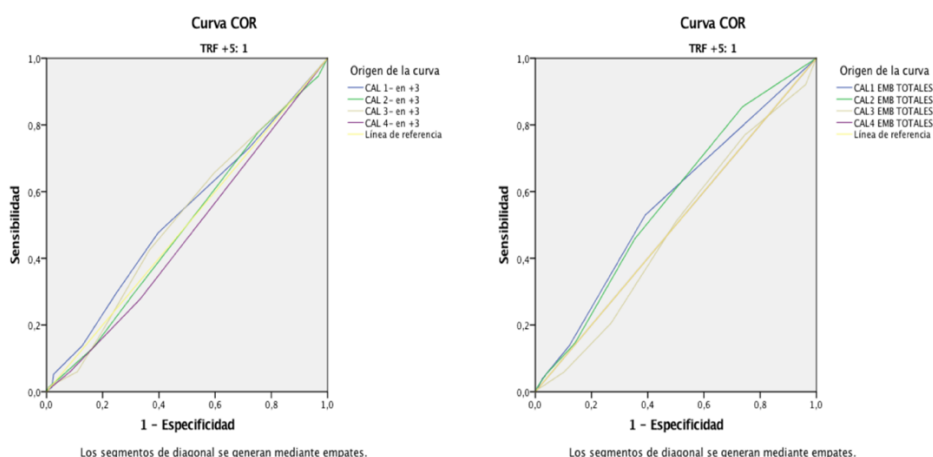


Figura 3: Modelos de curvas ROC para las calidades en día +3 y +5 en el grupo de receptoras de ovocitos.

RECEPTORAS DE OVOCITOS: TASA DE GESTACION CLÍNICA		Área	Error estándar	Significación asintótica	95% de intervalo de confianza asintótico	
					Límite inferior	Límite superior
CALIDAD DÍA +3	A	0,53	0,03	0,35	0,47	0,60
	B	0,50	0,03	0,90	0,43	0,56
	C	0,52	0,03	0,53	0,46	0,58
	D	0,47	0,03	0,38	0,41	0,53
CALIDAD DÍA +5	A	0,56	0,03	0,04	0,50	0,63
	B	0,57	0,03	0,03	0,51	0,63
	C	0,48	0,03	0,64	0,42	0,55
	D	0,50	0,03	0,10	0,43	0,56

Tabla: 36: Área bajo la curva ROC y significación estadística para las calidades embrionarias propuestas en día +3 y +5 en el grupo de receptoras de ovocitos.

RESULTADOS

Ovocitos propios

En este grupo de pacientes, la división etaria se volvió a establecer en los 35 años y se compararon las calidades propuestas en día +3 frente a las calidades en día +5 mediante modelos de curvas ROC.

➤ Pacientes menores de 35 años

Cuando las pacientes tuvieron menos de 35 años, se observó los embriones de calidad C en día +3, tuvieron un valor significativamente predictivo en la consecución del embarazo, con una sensibilidad del 95%, una especificidad del 80% y un área bajo la curva ROC de 0,60 (figura 4).

Sin embargo, las demás calidades analizadas, tanto en día +3 como en día +5, no tuvieron un valor predictivo para la consecución del embarazo (tabla 37).

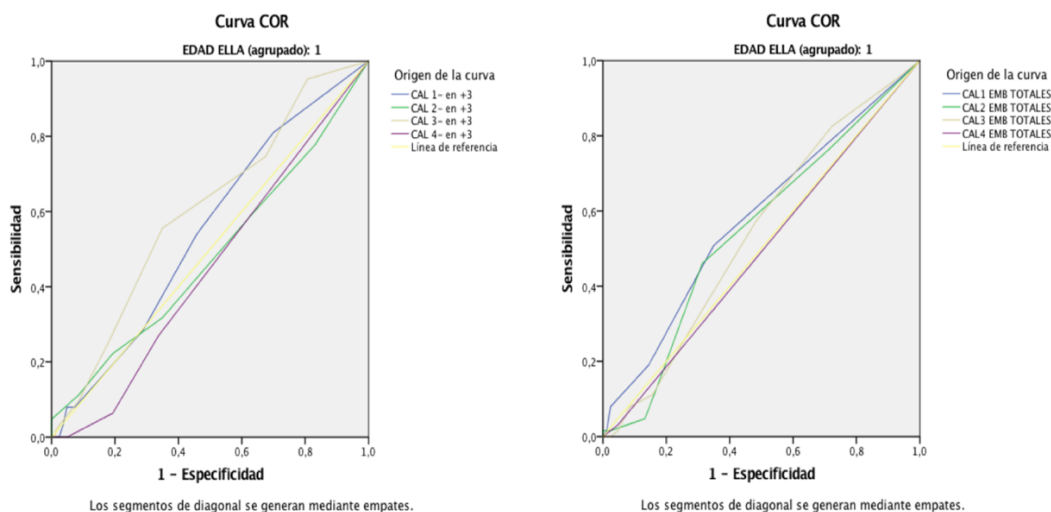


Figura 4: Modelos de curvas ROC para las calidades en día +3 y +5 en el grupo de pacientes menores de 35 años con ovocitos propios.

RESULTADOS

OVOCITOS PROPIOS < 35 AÑOS: TASA DE GESTACION CLÍNICA		Área	Error estándar	Significación asintótica	95% de intervalo de confianza asintótico	
					Límite inferior	Límite superior
CALIDAD DÍA +3	A	0,55	0,05	0,33	0,45	0,64
	B	0,48	0,05	0,71	0,39	0,58
	C	0,60	0,05	0,04	0,51	0,69
	D	0,45	0,05	0,30	0,36	0,54
CALIDAD DÍA +5	A	0,58	0,05	0,10	0,48	0,67
	B	0,55	0,05	0,33	0,45	0,64
	C	0,54	0,05	0,39	0,45	0,63
	D	0,49	0,05	0,86	0,40	0,59

Tabla 37: Área bajo la curva ROC y significación estadística para las calidades embrionarias propuestas en día +3 y +5 en el grupo de pacientes menores de 35 años con ovocitos propios.

➤ Pacientes mayores de 35 años

En el grupo de pacientes mayores de 35 años, se pudo observar que las calidades A y B propuestas en día +5, tuvieron un valor predictivo significativo para la consecución del embarazo a diferencia del resto de las calidades estudiadas en día +3 (tabla 38).

Los embriones de calidad A tuvieron una sensibilidad del 49%, una especificidad del 22% y un área bajo la curva ROC de 0,64, sin embargo, los embriones de calidad B su sensibilidad fue del 72%, su especificidad del 60% y su área bajo la curva de 0,59 (figura 5).

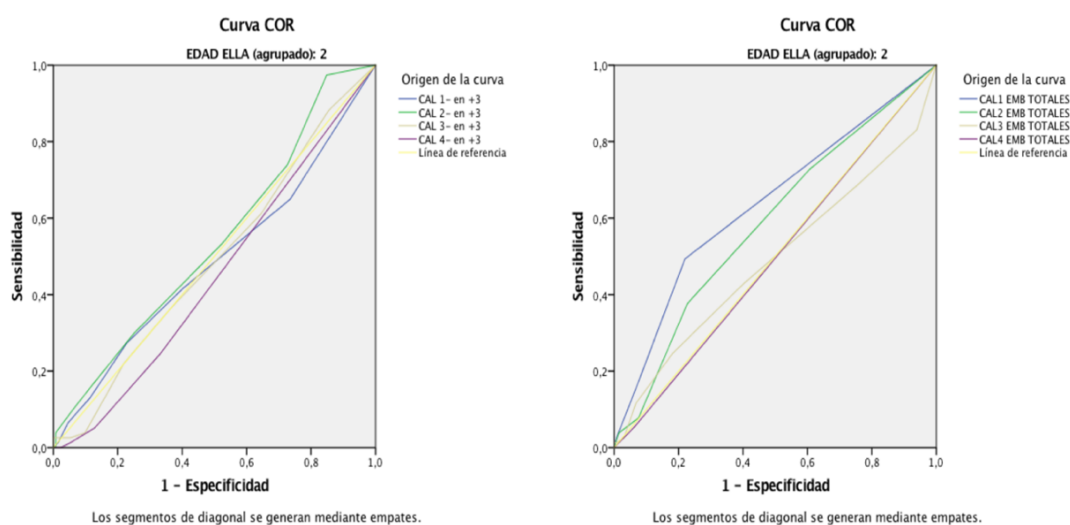


Figura 5: Modelos de curvas ROC para las calidades en día +3 y +5 en el grupo de pacientes mayores de 35 años con ovocitos propios.

RESULTADOS

OVOCITOS PROPIOS > 35 AÑOS: TASA DE GESTACIÓN CLÍNICA		Área	Error estándar	Significación asintótica	95% de intervalo de confianza asintótico	
					Límite inferior	Límite superior
CALIDAD DÍA +3	A	0,49	0,04	0,75	0,40	0,57
	B	0,54	0,04	0,35	0,46	0,62
	C	0,49	0,04	0,83	0,41	0,57
	D	0,45	0,04	0,22	0,37	0,53
CALIDAD DÍA +5	A	0,64	0,04	<0,01	0,56	0,72
	B	0,59	0,04	0,03	0,51	0,67
	C	0,49	0,04	0,82	0,40	0,58
	D	0,50	0,04	0,92	0,41	0,58

Tabla 38: Área bajo la curva ROC y significación estadística para las calidades embrionarias propuestas en día +3 y +5 en el grupo de pacientes mayores de 35 años con ovocitos propios.

COMBINACIÓN DE VARIABLES CON VALOR PREDICTIVO

Se realizaron distintas combinaciones de variables potencialmente predictivas para la consecución del embarazo entre los distintos grupos de estudio.

De todas las combinaciones realizadas (datos no mostrados) se encontró una la combinación con un valor predictivo significativo para los embriones de tipo eclosión y expandidos en el grupo de pacientes mayores de 35 años con ovocitos propios (figura 6).

Esta combinación tuvo una sensibilidad del 96%, una especificidad del 85% y un área bajo la curva ROC de 0,67 (tabla 39).

OVOCITOS PROPIOS > 35 AÑOS: TASA DE GESTACIÓN CLÍNICA	Área	Error estándar	Significación asintótica	95% de intervalo de confianza asintótico	
				Límite inferior	Límite superior
ECLOSIÓN + EXPANDIDO	0,67	0,06	0,01	0,54	0,79

Tabla 39: Área bajo la curva ROC y significación estadística para la combinación de blastocistos de tipo eclosión y expandidos en el grupo de pacientes mayores de 35 años con ovocitos propios.

RESULTADOS

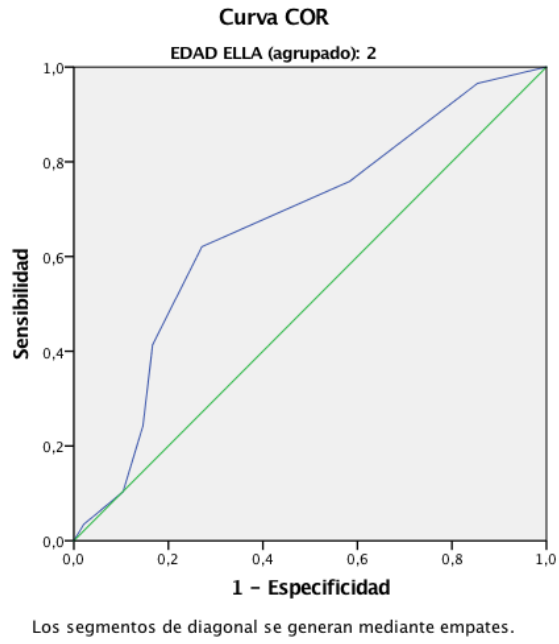


Figura 6: Modelo de curva ROC para la combinación de blastocistos de tipo eclosión y expandidos en el grupo de pacientes mayores de 35 años con ovocitos propios.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El genoma embrionario está compuesto por el genoma materno y paterno, sin embargo, este último realmente empieza a expresarse a partir de día +3 de desarrollo, por tanto, durante los primeros días el embrión será más dependiente del ovocito que del espermatozoide (17). Por esta razón, la información que proporciona el cultivo largo hasta blastocisto fue la más completa y apropiada para estudiar el efecto del factor femenino y masculino sobre el embrión, así como su repercusión en la consecución del embarazo, principal objetivo de los TRA.

Desde los inicios de la RA, los laboratorios de FIV tratan de conseguir seleccionar el mejor embrión de la cohorte del ciclo para transferir con el fin de conseguir un embarazo evolutivo y un recién nacido sano en casa. El principal método de selección de los embriones con mayor potencial de implantación sigue siendo la morfología embrionaria. A lo largo este trabajo se tuvo en cuenta el predominio del factor femenino y masculino en el cultivo a blastocisto y la consecución del embarazo, así como, la influencia de las calidades embrionarias propuestas en día +3 y +5 de desarrollo.

1. EVALUAR EL FACTOR OVOCITARIO Y VER CÓMO INFLUYE LA EDAD MATERNA EN EL DESARROLLO DE LOS EMBRIONES DESDE DÍA +1 HASTA DÍA +5 O +6, ASÍ COMO, EN LA CONSECUCIÓN DEL EMBARAZO.

La fecundación puede definirse como la unión física del espermatozoide y el óvulo para producir un cigoto. Durante los tres primeros días de desarrollo, en el embrión no hay transcripción génica, por tanto, el control genético es llevado a cabo exclusivamente por la información presente en el ovocito (61). Este hecho nos hace pensar que la calidad ovocitaria puede ser un factor determinante en la consecución de un embrión viable que dé lugar a un embarazo a término.

Se sabe que la calidad ovocitaria disminuye a medida que aumenta la edad materna, sobre todo a partir de los 35 años (62, 63). Cuando se dan tales circunstancias, disminuyen las tasa de gestación y aumenta la de abortos espontáneos (64).

Este descenso en las tasas de gestación y aumento en la de aborto, se vio reflejado en nuestros datos cuando las pacientes usaron sus propios ovocitos. Esta fue la razón por la que se

DISCUSIÓN

hicieron grupos de edades en este tipo de pacientes, pudiéndose de esta manera, estudiar más detalladamente el efecto etario (tabla 6).

En nuestro estudio las pacientes que hicieron ciclo con sus propios ovocitos tuvieron una media de edad de $36,38 \pm 4,04$ mientras que las que se sometieron a una recepción de ovocitos tuvieron una media de edad más alta ($41,46 \pm 4,02$ años) (tabla 1).

Según nuestros resultados, en el grupo de pacientes con ovocitos propios donde se usaron donantes de semen (tabla 8), es decir, cuando el problema no fue masculino, los peores resultados fueron para el grupo de edad materna 4 (40-45 años). De hecho, en este grupo de edad, no se reportó ningún embarazo evolutivo y la tasa de aborto fue la más alta de todos los grupos (11% vs 0%), aunque sin diferencias significativas (tabla 8).

Cabe destacar que, aunque el número de embriones en día +3 fue muy similar en los cuatro grupos de edad (no hubo diferencias significativas), la tasa de llegada a blastocisto disminuyó significativamente a partir del grupo 2 (30-35 años) (grupo 1: 71,73% vs grupo 2: 53,07%) (tabla 8).

Respecto a la tasa de gestación clínica y evolutiva, la primera fue estadísticamente similar en todos los grupos de edad (sin diferencias significativas) pero la segunda, fue nula a partir de los 40 años, con diferencias significativas al comparar el grupo 4 (40-45 años) con el resto de grupos (tabla 8). Por tanto, se podría deducir que las pacientes con edades comprendidas entre los 30-40 años (grupos 2 y 3), aunque tuvieron una menor tasa de llegada a blastocisto (a partir de los 30 años ésta disminuyó significativamente), los embriones que fueron capaces de llegar y se transfirieron, dieron lugar a una tasa de gestación clínica y evolutiva de manera estadísticamente similar que las pacientes menores de 30 años (grupo 1) (tabla 8).

Estos resultados se apoyaron en la hipótesis de que el cultivo largo, en las pacientes pertenecientes a los grupos de edad 2 y 3 (30-40 años), podría conferirles una ventaja a favor frente a las transferencias en día +3, seleccionando únicamente aquellos embriones que fueron capaces de convertirse en blastocistos, y por consiguiente, los que tuvieron un mayor potencial de implantación. Otro resultado que apoyaría dicha hipótesis fue que hasta los 40 años, la tasa de aborto fue nula, este hecho podría deberse a que las transferencias se hicieron en estadio de blastocisto, es decir, se transfirieron embriones con su genoma activado y con mayor potencial de implantación, por tanto, la transferencia de blastocistos podría reducir además la tasa de aborto en este grupo de pacientes (grupos 2 y 3: 30-40 años).

DISCUSIÓN

De esta manera, las pacientes incluidas en este intervalo de edad (grupos 2 y 3: 30-40 años), podrían verse doblemente beneficiadas por el cultivo largo: por un lado serviría para cribar los embriones desde día +3 a +5 mejorando así la selección embrionaria y, por el otro, lograría disminuir su tasa de aborto puesto que, únicamente se transferirán aquellos embriones capaces de activar su genoma embrionario y llegar a blastocisto.

Un dato inesperado que se registró, en este grupo de pacientes con ovocitos propios y semen de donante, fue en la tasa de fecundación, donde se observaron diferencias significativas a favor de las pacientes pertenecientes al grupo de edad 4 (40-45 años) cuando se comparó con el grupo 1 (<30 años), siendo en este grupo de edad, donde se registró la tasa más baja de todos los estudiados (grupo 1: 56,86% vs grupo 4: 72,50%) (tabla 8). Una posible justificación a este resultado se basó en la premisa de que las pacientes menores de 30 años, se tuvieron que someter a una ICSI a pesar de su corta edad. Este hecho podría implicar un problema ovocitario subyacente que hace que los ovocitos puedan tener alguna complicación al activarse por la entrada del espermatozoide impidiéndoles una correcta fecundación. Sin embargo, los que fueron capaces de conseguir dicha fecundación, fueron capaces de llegar a blastocisto y conseguir un embarazo con las tasas más altas de todos los grupos de edad estudiados (tasa de gestación evolutiva en grupo 1: 60% vs grupo 4: 0%) (tabla 8).

Cabe destacar también que, el número de ovocitos que se pudo microinyectar disminuyó significativamente a partir de los 35 años (grupo 1: $18,80 \pm 6,06$ vs grupo 3: $12,00 \pm 4,83$) (tabla 8). Esta disminución está provocada por el factor etario, que hace que a medida que aumenta la edad materna, disminuya la reserva ovárica y, por consiguiente, el número de ovocitos disponibles.

A nivel embrionario (variables estudiadas en el bloque 2, tabla 9) se pudo observar que, el número de embriones de calidad C que se transfirieron fue significativamente mayor a partir de los 30 años (grupo 1: 0 vs grupo 2: $0,80 \pm 0,77$) y, el número de embriones de tipo expandido disminuyó a partir de los 35 años (grupo 1: $4,20 \pm 1,48$ vs grupo 2: $1,79 \pm 1,58$). Por tanto, las mejores calidades y los embriones más evolucionados los obtuvieron las pacientes menores de 35 años (tabla 9).

Estos resultados estuvieron de acuerdo con el trabajo de Yavetz (95), donde expuso que tanto la tasa de llegada a blastocisto, como el número de blastocistos más evolucionados, se vieron reducidos significativamente en pacientes mayores de 30 años. La expansión del blastocisto precede a la eclosión y la implantación. Por tanto, los datos de este estudio (95)

DISCUSIÓN

parecen corroborar nuestros resultados donde también encontraron una disminución significativa de embriones de tipo expandido en pacientes mayores de 40 años (el 36% de pacientes mayores 40 años tuvo al menos un blastocisto de tipo expandido *versus* el 82% de pacientes menores de 30 años).

Todos estos análisis preliminares se pudieron corroborar cuando se analizó el valor predictivo del factor etario en los pacientes con ovocitos propios (tabla 26), donde se observó que las pacientes menores de 30 años tuvieron 2,31 y 3,22 veces más probabilidad de que sus embriones llegasen a blastocisto y consiguieran una gestación clínica, respectivamente. Cuando las pacientes fueron menores de 35 años, éstas también se vieron beneficiadas, aunque solo en la tasa de llegada a blastocisto (OR = 1,70) (tabla 26).

Por tanto, los resultados más exitosos se vieron reflejados en pacientes menores de 30 años, con una disminución de los mismos a partir de los 35, de acuerdo a lo descrito en la bibliografía (62, 63, 64). Por esta razón, se consideró como buen punto de inflexión los 35 años al categorizar a las pacientes en función de la edad materna en algunos apartados de este trabajo.

Una posible explicación de la disminución de la calidad ovocitaria en función de la edad materna, podría tener su origen durante la maduración ovocitaria, donde el ovocito aumenta en cantidad y calidad su citoplasma (96). Por tanto, teniendo en cuenta que durante los tres primeros días, el embrión depende de las reservas presentes en el ovocito hasta la activación de su propio genoma embrionario, el aumento en cantidad y calidad del citoplasma ovocitario podría optimizar la formación de un embrión viable.

Se han encontrado estudios (96, 97) que apoyan y relacionan estas premisas mostrando que, a medida que la edad materna aumenta, la calidad citoplasmática del ovocito empeora y ésta, influye directamente en la competencia de los embriones generados a partir de ellos. Estos trabajos también sostienen que los ovocitos de mayor calidad, contienen niveles de ATP significativamente más altos y tienen más probabilidades de llegar a blastocisto.

Por tanto, es muy probable que la capacidad de desarrollo inicial del embrión dependa de los componentes citoplasmáticos (ARNm materno, proteínas y mitocondrias) ya presentes en el ovocito primordial o adquiridos por el ovocito durante su crecimiento folicular en los ovarios (96).

DISCUSIÓN

Según el grupo de Olszanska (98), las especies de mamíferos con mayor contenido de ARN materno en los ovocitos mostraron una menor tasa de parada embrionaria *in vitro*. Por consiguiente, la disminución en la tasa de llegada a blastocisto observada en pacientes de edad avanzada, tal y como se ha podido observar en nuestros datos, podría estar relacionada con la disminución del ARN o de proteínas que sufren los ovocitos envejecidos.

Respecto a las mitocondrias, su herencia es estrictamente materna porque las mitocondrias paternas son descartadas por el ovocito. Estos orgánulos citoplasmáticos se van acumulando en el ovocito maduro aumentando su número de 6.000 por célula germinal primordial a 300.000 en la etapa de MII y, no se produce ningún aumento entre la fecundación y el embrión en estadio de blastocisto. Por tanto, la cantidad total de ADN mitocondrial (ADNmit) presente en el ovocito en MII se debe dividir entre las células del embrión, de hecho, por esta razón, en día +5 o +6 el embrión contiene muchas menos copias de ADNmit en comparación con el ovocito original o el cigoto recién formado. De esta manera, la enorme cantidad de ADNmit acumulada en el ovocito en MII y, el hecho de que no aumente su número hasta blastocisto, han contribuido a relacionar este parámetro con la viabilidad del embrión (96). Además, en las mujeres reproductivamente mayores, los ovocitos y folículos primordiales habrán estado expuestos a la respiración mitocondrial durante décadas, lo que conlleva un posible daño acumulativo en las mitocondrias y en su ADNmit (99).

Otra explicación que podría esclarecer la disminución de la calidad ovocitaria por el factor etario, fue el aumento de anomalías cromosómicas en los ovocitos, especialmente aneuploidías, a medida que aumentó la edad materna (65, 66, 100, 101). La mayoría de las aneuploidías producen embriones que no serán capaces de llegar a blastocisto, ni van a dar lugar a un embarazo y si lo hicieran, producirían abortos (66, 102). De ahí, la disminución de la tasa de llegada a blastocisto, gestación clínica y el aumento de la tasa de aborto a medida que el factor etario fue más acusado, tal y como hemos podido observar en nuestros resultados.

Por tanto, el factor etario podría provocar defectos en el ARNm materno (98), alterar las proteínas ovocitarias (96) y su función mitocondrial (99) además de, causar una segregación cromosómica incorrecta durante el proceso de meiosis en la ovogénesis. La separación de forma desigual de los cromosomas maternos conlleva a la formación de aneuploidías (103) (imagen 23).

Por tanto, como la calidad de los embriones generados a partir de ovocitos envejecidos se vio reducida (60), el modelo más adecuado para contrastar este fenómeno fue transferir

DISCUSIÓN

embriones procedentes de "ovocitos más jóvenes" a mujeres de edad más avanzada. El fin fue conseguir unas tasas de gestación evolutiva similares a las observadas en pacientes jóvenes, es decir, analizar los resultados cuando las pacientes reproductivamente mayores se incluyeron en el programa de donación de ovocitos.



Imagen 23: Diagrama de flujo explicativo de la disminución de calidad ovocitaria por el factor etario.

Es bien conocido desde hace décadas, tal y como ya expuso Abdalla (104) en 1993, que las tasas de gestación clínica y evolutiva en las receptoras de ovocitos eran significativamente más altas y la tasa de abortos significativamente más baja que cuando usaban sus propios ovocitos, de acuerdo a lo observado también en nuestro trabajo (tablas 2 y 18).

Nuestros datos mostraron una mayor tasa de fecundación, mayor número de embriones en día +3, mayor tasa de llegada a blastocisto y de gestación clínica y evolutiva cuando los ovocitos fueron donados (tabla 2).

De igual modo, también se pudo observar que, el número de blastocistos más evolucionados tales como, eclosionados, expandidos y blastocistos, fue mayor en las receptoras de ovocitos que en las pacientes con ovocitos propios. Sin embargo, los blastocistos menos evolucionados (tempranos, cavitando y mórulas compactas) fueron más numerosos en el grupo de pacientes con ovocitos propios (tabla 3).

DISCUSIÓN

Por último, cuando se tuvo en cuenta la tasa de cancelación y de implantación, se observó que la primera fue menor (1,18% vs 1,45%) y la segunda mayor (44,82% vs 35,96%) en el grupo de receptoras de ovocitos (tabla 4).

Para poder corroborar dicha disminución de la calidad ovocitaria en función de la edad materna, se analizó el valor predictivo del origen de los ovocitos (propios o donados) mediante una regresión logística binaria (tabla 25). Tras analizar dichos resultados, se observó que las receptoras de ovocitos se vieron beneficiadas frente a las pacientes con ovocitos propios, teniendo 1,61 y 1,49 más probabilidad en la tasa de llegada a blastocisto y en la consecución de una gestación clínica, respectivamente. Estos datos se vieron apoyados con los resultados observados en la bibliografía (60, 96, 97).

Por último, cuando se comparó la calidad seminal en las receptoras de ovocitos, se observó que ninguna de las calidades estudiadas tuvo diferencias significativas en las variables estudiadas (tabla 18). Por consiguiente, y en concordancia con estos datos, se pudo deducir que fue más determinante la calidad del ovocito que la calidad seminal, puesto que tener un ovocito joven pudo paliar las calidades seminales más alteradas, tal y como mostraron nuestros datos (tabla 18).

Esta premisa se vio fortalecida cuando se analizó este hecho en el grupo de ovocitos propios, donde sí que se observaron diferencias significativas según la calidad seminal tal y como se explicará en el siguiente apartado. Cabe destacar que las pacientes menores de 35 años pertenecientes al grupo de ovocitos propios no fueron comparables a las donantes de ovocitos de la misma edad, ya que las primeras son pacientes con problemas de fertilidad y las segundas, son mujeres sanas en edad reproductiva sin problemas aparentes de fertilidad.

2. EVALUAR EL FACTOR MASCULINO Y VER COMO SE RELACIONA LA CALIDAD SEMINAL EN EL DESARROLLO DE LOS EMBRIONES DESDE DÍA +1 HASTA DÍA +5 O +6, ASÍ COMO, EN LA CONSECUCIÓN DEL EMBARAZO.

Tradicionalmente, los espermatozoides han sido considerados como un vehículo de entrega del material genético paterno al óvulo, aunque hoy en día, se sabe que realmente aportan más que su ADN (105).

DISCUSIÓN

Los ovocitos aguardan la fecundación detenidos en la metafase de la segunda mitosis (MII), conservando todavía los dos juegos completos de cromosomas. La activación del ovocito por el espermatozoide da como resultado la finalización de la segunda mitosis y la extrusión de la mitad de los cromosomas maternos en forma de un segundo CP, acompañado por el bloqueo de la polispermia (13).

Al igual que la ovogénesis, la espermatogénesis también implica dos divisiones mitóticas seguidas, dando lugar a un espermatozoide haploide. A diferencia de los cromosomas maternos, que pueden formar fácilmente un PN femenino después de completar su segunda mitosis, la cromatina paterna requiere una etapa de procesamiento adicional. Dicho procesamiento, comprende la sustitución de las protaminas unidas al ADN por las histonas derivadas del ovocito, antes de poder participar en el desarrollo pronuclear y la singamia (106).

El desarrollo pronuclear implica la unión de los cromosomas maternos y paternos en un genoma zigótico mediante la fusión de los PN. Este proceso está guiado por los microtúbulos, que están formados por un centrosoma compuesto por dos centriolos cilíndricos rodeados de material pericentriolar. Éstos, se duplican en la mitosis o meiosis para dar lugar a los dos polos del huso mitótico/meiótico.

En los espermatozoides, el centrosoma está implicado inicialmente en la generación del axonema y, posteriormente, se convierte en un único centriolo inactivo. Las proteínas del material pericentriolar, son expulsadas del espermatozoide en forma de gota citoplasmática para permitir la motilidad espermática necesaria para alcanzar el ovocito. Los ovocitos por su parte, pierden ambos centriolos durante la ovogénesis, pero acumulan un exceso de proteínas pericentriolares.

Así, el centriolo aportado por los espermatozoides utiliza el material pericentriolar de los ovocitos para su duplicación y conversión a un centrosoma zigótico activo capaz de guiar el desarrollo pronuclear y la formación del primer huso mitótico (106). Por tanto, el desarrollo embrionario depende del centriolo transmitido por el espermatozoide.

La maduración de los espermatozoides en el epidídimo puede considerarse como una fase de control de calidad que garantiza la producción de espermatozoides sanos, dando lugar a muestras espermáticas con parámetros seminales normales.

DISCUSIÓN

Los trabajos de Kdous (61) y Parinaud (107) han demostrado que, los resultados de la ICSI no dependen de la calidad de los parámetros seminales (concentración, motilidad y/o morfología), excepto cuando se microinyecta un espermatozoide no viable.

Según nuestros datos, el grupo de pacientes más adecuado para poder estudiar el efecto del factor masculino fue el grupo de receptoras de ovocitos, donde la calidad ovocitaria se mantuvo estable. Según la tabla 18, no se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando la calidad seminal estuvo alterada en comparación con calidades seminales normales.

Por tanto, cuando los ovocitos fueron donados, la tasa de fecundación fue muy similar (no observándose diferencias significativas) en todos los grupos de calidad seminal, al igual que el número de embriones en día +3, la tasa de llegada a blastocisto, la de gestación clínica, aborto y gestación evolutiva (tabla 18). De estos datos se podría deducir que, en este grupo de pacientes, el ovocito sano y joven fue capaz de soportar y reparar en cierta medida las alteraciones seminales.

En este grupo de pacientes, cabe destacar también que, aunque sin diferencias significativas, las tasas de gestación clínica y evolutiva fueron más altas en los grupos con calidad seminal alterada (tabla 18). Estos resultados nos hicieron pensar que, el problema reproductivo de estos pacientes fuera precisamente la alteración de la calidad seminal, pudiéndose solventar con la técnica ICSI. Mientras que, cuando la calidad seminal fue normal, hubo un problema subyacente que desconocemos y explicaría porque tuvieron tasas más bajas.

Estos resultados se vieron contrastados con lo concluido en otros estudios (61, 108, 109) donde tampoco encontraron diferencias estadísticamente significativas en las tasas de implantación, gestación clínica, o aborto. En contraste, el estudio realizado por Mercan (110), sí encontró diferencias significativas en la tasa de fecundación cuando la calidad seminal estuvo alterada, pero no en las tasas de gestación clínica, manteniéndose estables.

A nivel embrionario (variables incluidas en el bloque 2, tabla 19) se observó que, el número de embriones de tipo blastocisto fue mayor cuando la calidad seminal fue normozoospermica, con morfología normal o cuando se usaron donantes de semen. Por el contrario, cuando la calidad seminal no fue normozoospermica o tuvo la morfología alterada, el número de embriones de tipo temprano fue mayor. Es decir, los embriones menos evolucionados fueron más numerosos en aquellos pacientes con calidades seminales alteradas, en contraste con los embriones más evolucionados, que fueron característicos de calidades seminales normales (tabla 19).

DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta tales resultados: las calidades seminales alteradas produjeron blastocistos menos evolucionados que los producidos por calidades normales, lo más eficiente para las receptoras de ovocitos fue realizar un cultivo largo, para poder seleccionar los embriones más evolucionados de la cohorte del ciclo.

Por tanto, según nuestros datos y en concordancia con otros autores (31, 61), el cultivo a blastocisto pudo considerarse como parte de la selección natural que sufren los embriones durante su desarrollo embrionario, siendo únicamente aquellos que llegan a dicho estadio, los que tienen mayores probabilidades de implantación y embarazo tras la transferencia.

Cuando la calidad seminal se estudió en el grupo de pacientes con ovocitos propios (tabla 7), ésta se tuvo que estratificar además por edad materna (tabla 6) observándose que, para la calidad seminal más alterada, los pacientes con muestras seminales OTAN (tabla 16), la tasa de fecundación y el número de embriones en día +3 fue similar en todas las edades maternas. Sin embargo, la tasa de llegada a blastocisto disminuyó significativamente a partir de los 35 años (grupo 1 (< 30 años): 66,54% vs grupo 3 (35-40 años): 45,45%). De la misma manera disminuyó también, la tasa de gestación clínica y evolutiva (grupo 1: 60% vs grupo 3: 10%).

En este grupo de pacientes con ovocitos propios y calidad seminal OTAN, a nivel embrionario (variables estudiadas en el bloque 2, tabla 17), se observaron más embriones de calidad B en día +5 cuando las pacientes tuvieron menos de 30 años (grupo 1 (< 30 años): $2,20 \pm 1,48$ vs grupo 2 (30-35 años): $1,08 \pm 0,99$). A partir de dicha edad, este tipo de embrión disminuyó significativamente. En día +3, las pacientes menores de 35 años (grupos 1 y 2), tuvieron un mayor número de embriones de calidad B que posteriormente fueron transferidos en día +5 (grupo 2: $0,83 \pm 0,72$ vs grupo 3 (35-50 años): $0,20 \pm 0,42$). Además, a partir de los 35 años (grupo 3), el número de blastocistos de tipo expandido se vio disminuido estadísticamente (grupo 2 (30-35 años): $3,08 \pm 1,73$ vs grupo 3 (35-40 años): $1,90 \pm 2,33$) (tabla 17).

Cuando la calidad seminal tuvo en común la morfología alterada (pacientes común teratozoospermia, tabla 14), la tasa de fecundación y el número de embriones en día +3 fue muy similar (sin diferencias significativas) en todos los grupos de edad materna. Sin embargo, la tasa de llegada a blastocisto se vio estadísticamente disminuida a partir de los 40 años (grupo 4) (grupo 1: 67,66% vs grupo 4: 55,63%). La tasa de gestación clínica y evolutiva fue significativamente mayor en pacientes menores de 30 años (grupo 1) que en el siguiente rango de edad (grupo 2: 30-35 años) (tasa de gestación evolutiva en el grupo 1: 58,80% vs grupo 2: 29,40%).

DISCUSIÓN

A nivel embrionario (tabla 15), el grupo de edad materna 4 (40-45 años) tuvo menos embriones de calidad B en día +5 (grupo 3 (35-40 años): $1,26 \pm 1,07$ vs grupo 4: $0,73 \pm 0,88$) y, más embriones de calidad D que el resto de pacientes (grupo 3: 0 vs grupo 4: $0,18 \pm 0,39$). Cuando se tuvo en cuenta el tipo de blastocisto que llegaron a formar, se observó que, hubo más embriones de tipo eclosión en el grupo de edad materna 1 (<30 años) (grupo 1: $1,29 \pm 1,26$ vs Grupo 2: $0,65 \pm 0,89$) y, más de tipo expandido en menores de 40 años (Grupo 2: $2,75 \pm 1,62$ vs Grupo 4: $1,86 \pm 1,52$). Estos datos nos podrían indicar que, las mejores calidades y los embriones más evolucionados los tuvieron las pacientes menores de 35 años, a pesar de la alteración en la morfología de las muestras de semen.

Cuando la calidad seminal no fue normozoospermica (tabla 12), es decir, al menos algún parámetro seminal estuvo alterado, la tasa de fecundación, el número de embriones en día +3 y la tasa de llegada a blastocisto, fue muy similar en todos los grupos estudiados (sin diferencias significativas). Sin embargo, la tasa de gestación clínica y evolutiva fue disminuyendo significativamente a partir del grupo de edad 1 (<30 años) (grupo 1: 63% vs grupo 2: 28%). Por tanto, una vez más, se pudo apreciar como el ovocito joven fue capaz de soportar calidades seminales alteradas, reparando en cierta medida el daño espermático y siendo capaz de conseguir un embarazo evolutivo.

A nivel embrionario (tabla 13), a partir de los 30 años (grupo 2), se observó un mayor número de embriones de calidad C para transferir en día +5 (grupo 2: $0,32 \pm 0,69$ vs grupo 4: $0,63 \pm 0,74$). Respecto a los embriones totales que se obtuvieron ese día, se observó una disminución significativa en el número de embriones de calidad A en el grupo de edad 4 (40-45 años) (grupo 2: $0,58 \pm 0,81$ vs grupo 4: $0,22 \pm 0,51$). De la misma manera, los embriones de calidad C disminuyeron a partir del grupo 4, aunque los de calidad D, aumentaron a partir de dicho grupo edad materna (grupo 3: $0,04 \pm 0,20$ vs grupo 4: $0,15 \pm 0,36$).

Cuando se tuvo en cuenta el tipo de blastocisto formado se pudo observar que, el grupo de edad 1 (<30 años), tuvo más embriones de tipo eclosión que el resto de grupos (grupo 1: $1,21 \pm 1,25$ vs grupo 3: $0,56 \pm 0,89$). A partir del grupo de edad 4 (40-45 años), se observó un menor número de embriones de tipo expandido que en los anteriores grupos de edad (grupo 3 (35-40 años): $2,40 \pm 1,78$ vs grupo 4: $1,59 \pm 1,53$).

Por último, cuando la calidad seminal fue normozoospermica (tabla 10), es decir, cuando todos los parámetros seminales estuvieron dentro de la normalidad según (88), la tasa de fecundación y el número de embriones en día +3 fue muy similar en todos los grupos de edad

DISCUSIÓN

materna (sin diferencias significativas). Aunque, la tasa de llegada a blastocisto se vio significativamente disminuida a partir del grupo de edad 4 (40-45 años) (grupo 2 (30-35 años): 69,14% vs grupo 4: 53,33%).

Un dato *a priori* inesperado, se observó en la tasa de gestación clínica y evolutiva en el grupo de pacientes de 40-45 años (grupo 4), donde dichas tasas, fueron significativamente mayores en este grupo de edad (tasa de gestación evolutiva en grupo 3 (35-40 años): 13% vs grupo 4: 43%).

Este resultado podría implicar que este grupo de pacientes (pacientes con ovocitos propios con una edad comprendida entre los 40-45 años y, con muestras seminales normozoospermicas) pudieron verse beneficiadas del cultivo largo, optimizando de esta manera, la selección de los embriones con mayor potencial de implantación (los que fueron capaces de llegar a blastocisto). Es decir, según nuestros datos, si los embriones de estas pacientes fueron capaces de llegar a blastocisto, esos blastocistos fueron capaces de conseguir la gestación. El hecho de que este fenómeno se observara cuando la calidad seminal fue normal, pudo significar que la calidad seminal alterada no fue un obstáculo más que el ovocito envejecido tuvo que superar.

Por otro lado, una posible explicación de por qué los pacientes pertenecientes al grupo 2 y 3 de edad (30-40 años) tuvieron una tasa de gestación clínica y evolutiva menor que las pacientes del grupo 4 (40-45 años), fue la posibilidad de que pudieran tener algún problema ovocitario y por esta razón y, a pesar de la calidad seminal normal, no consiguiesen la gestación ni de forma natural ni tras una ICSI.

A nivel embrionario (tabla 11), únicamente se observó un mayor número de embriones de calidad B en día +5 en el grupo de edad 2 (30-35 años) (grupo 2: $1,52 \pm 1,30$ vs grupo 3: $0,89 \pm 0,87$).

A la vista de nuestros datos, se pudieron resumir nuestros resultados teniendo en cuenta la tabla 40:

- Cuando se usaron donantes de semen: el límite de edad a partir del cual disminuyó la tasa de llegada a blastocisto fue de 30 años, pero a partir de esa edad, los embriones que fueron capaces de llegar a dicho estadio, fueron capaces de dar lugar a un embarazo evolutivo a las pacientes entre los 30-40 años. Por ello, el cultivo largo mejoró la selección embrionaria en esta franja de edad.

DISCUSIÓN

- Cuando la calidad seminal fue normozoospermica: el límite de edad a partir del cual disminuyó la tasa de llegada a blastocisto fue de 40 años, aunque estos pacientes (40-45 años) tuvieron una tasa de gestación evolutiva mayor. Con lo cual, según nuestros resultados, hubo menos blastocitos pero los que llegaron, fueron capaces de producir un embarazo evolutivo. Por tanto, el cultivo largo mejoró la selección embrionaria en este grupo de pacientes.
- Cuando la calidad seminal no fue normozoospermica: no hubo diferencias significativas en la tasa de llegada a blastocitos aunque, sí en la de gestación evolutiva, estando su punto de inflexión en los 30 años. Esto pudo significar que cuando el ovocito perteneció a pacientes mayores de 30 años, sí fue capaz de formar blastocistos de forma similar que los ovocitos pertenecientes a las menores de 30 años, pero no dieron lugar a un embarazo evolutivo como los ovocitos de pacientes menores de 30 años.
- Cuando la calidad seminal tuvo en común la teratozoospermia: el límite de edad a partir del cual disminuyó la tasa de llegada a blastocisto fue de 40 años, aunque la de gestación clínica fue a los 30 años. En este caso, hubo embriones que llegaron a ser blastocistos y llegaron a transferirse, pero no dieron lugar a un embarazo evolutivo en pacientes entre los 30-40 años. Según nuestros resultados, la morfología alterada no impidió que los embriones llegaran a blastocisto pero sí la consecución de un embarazo a término en dicha franja de edad.
- Cuando la calidad seminal fue OTAN: el límite de edad a partir del cual disminuyó la llegada a blastocisto fue de 35 años, al igual que la tasa de gestación evolutiva. Por tanto, hasta los 35 años, el ovocito fue capaz de soportar calidades seminales alteradas, pero a partir de esa edad, el ovocito ya no fue capaz de reparar dicho daño.

EDAD A LA QUE EMPIEZA A DISMINUIR

CALIDAD SEMINAL	TASA DE LLEGADA A BLASTOCISTO	TASA DE GESTACIÓN EVOLUTIVA
DONANTES	GRUPO 2 (30 años)	GRUPO 4 (40 años)
NORMOZOSPÉRMICOS	GRUPO 4 (40 años)	NS ²
NO NORMOZOSPÉRMICOS	NS ¹	GRUPO 2 (30 años)
COMUN TERATO	GRUPO 4 (40 años)	GRUPO 2 (30 años)
OTAN	GRUPO 3 (35 años)	GRUPO 3 (35 años)

Tabla 40: Resumen explicativo de la edad materna a la que empieza a disminuir la tasa de llegada a blastocisto y la gestación clínica. NS¹: no se observaron diferencias significativas entre los grupos de edad materna; NS²: en este caso la tasa de gestación fue mayor en el Grupo 4 (40-45 años).

DISCUSIÓN

De esta manera, la calidad ovocitaria parece que tuvo mayor atribución sobre los resultados de un TRA que la calidad seminal. Por tanto, cuando hubo buena calidad ovocitaria, la calidad seminal no fue tan influyente pero, cuando la calidad ovocitaria se vio disminuida (por el factor etario), la calidad seminal influyó en mayor medida sobre el embrión y, por consiguiente, sobre los resultados del ciclo.

Para corroborar esta premisa, se evaluó el valor predictivo de los grupos de calidad seminal y, ninguno de los cinco grupos (tabla 7) tuvo un valor predictivo significativo sobre la tasa de llegada a blastocisto o consecución de la gestación clínica, exceptuando la calidad seminal normozoospermica cuando las pacientes pertenecieron al grupo de ovocitos propios menores de 35 años (tablas 27, 28 y 29). Concretamente, este grupo de pacientes se vio beneficiado estadísticamente de la calidad seminal normal, teniendo hasta 3 veces más probabilidad de que lleguen al menos el 60% de los embriones a blastocisto (tabla 28). Este resultado pareció lógico puesto que, dicho grupo de pacientes (menores de 35 años y muestra seminal normozoospermica) fue el que tuvo mejor pronóstico *a priori* de todos los grupos analizados, debido a la edad materna y calidad seminal.

A pesar de haber obtenido un valor predictivo significativo en este grupo de pacientes, el resto de resultados anteriormente expuestos, nos hicieron suponer que el origen de los ovocitos (donados o propios) tuvo mayor valor predictivo que la calidad seminal.

Un posible razonamiento que pudo explicar nuestros resultados y la hipótesis de que la calidad seminal tuviera un menor valor predictivo que la calidad ovocitaria, se basó en que fue el propio embriólogo el que decidió que espermatozoide microinyectar, seleccionando únicamente aquellos espermatozoides móviles y morfológicamente normales de todos los que tuvo disponibles. Por tanto, el espermatozoide que se microinyectó en el citoplasma del ovocito, no fue necesariamente representativo de la población seminal estudiada, tal y como concluyó el grupo de Mansour (111). Por esta razón, los resultados obtenidos tras la ICSI podrían ser independientes del seminograma.

Referente a la morfología espermática, hay estudios donde no se registraron diferencias en las tasas de fecundación cuando la morfología fue menor del 4% (alterada) (112, 113), este fenómeno pudo explicarse suponiendo que no todos los espermatozoides fueron morfológicamente alterados, de tal manera que siempre se encontró alguno con una morfología más adecuada. Por esta razón, la importancia de la morfología espermática se está volviendo cada vez más ambigua con la llegada de la ICSI, que sobrepasa los límites inherentes para la

DISCUSIÓN

selección natural. Sin embargo, otros grupos de trabajo (114, 115) señalaron que, los espermatozoides morfológicamente anormales fueron generalmente aquellos que portaron anomalías cromosómicas que transmitieron a los embriones, provocando que la tasa de gestación evolutiva se viera reducida.

Según nuestros datos, cuando la morfología estuvo alterada (grupo común teratozoospermia), la tasa de gestación evolutiva fue disminuyendo de forma drástica en las pacientes con ovocitos propios a partir de los 30 años (tabla 14), mientras que, en las receptoras de ovocitos esta alteración seminal no influyó de manera significativa en los resultados (tabla 18). Por tanto, este resultado corroboraría la hipótesis de que la calidad ovocitaria fue más determinante que la calidad seminal en la consecución del embarazo, ya que el ovocito joven y por consiguiente de buena calidad, tuvo la capacidad de reparar en cierta medida dicho daño espermático.

De cualquier modo, siempre se elegirán los mejores espermatozoides disponibles en la muestra seminal para realizar la ICSI, con el fin de paliar de esta manera, las calidades seminales más alteradas, siempre y cuando el ovocito no se haya visto afectado por el factor etario.

3. ESTUDIAR Y ANALIZAR EL EFECTO DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO EN EL DESARROLLO DEL EMBRIÓN Y LA CAPACIDAD DEL OVOCITO PARA REPARAR ESTE DAÑO ESPERMÁTICO.

Aproximadamente el 20% de las parejas sufre infertilidad de origen desconocido. Este tipo de infertilidad podría estar relacionada con la integridad genética de los espermatozoides.

La fragmentación del ADN es la anomalía más común del ADN en los gametos masculinos y su análisis se considera un indicador de calidad seminal. Actualmente, se sabe que los espermatozoides que contienen el ADN fragmentado pueden estar vivos, ser morfológicamente normales e incluso, capaces de fecundar correctamente un ovocito (82). Esto significa que las muestras seminales con altos niveles de fragmentación no son fácilmente detectables en los seminogramas rutinarios (85, 116) y, la posibilidad de elegir un espermatozoide con el ADN dañado para realizar la ICSI debe tenerse en cuenta. De hecho, la probabilidad de conseguir un embarazo de forma natural se estima cercana a cero cuando la proporción de espermatozoides con daño en el ADN supera el 27% (117).

DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta tales premisas, en este trabajo se examinaron los resultados reproductivos en función del índice de espermatozoides con el ADN fragmentado (IFE).

Para ello, en un primer análisis, se quiso conocer si hubo alguna calidad seminal más susceptible a tener dicho parámetro alterado. En la tabla 20 se pudo observar que, cuando la calidad seminal fue normozoospermica, hubo significativamente más muestras seminales con un IFE normal (IFE <27%: $0,25 \pm 0,43$ vs IFE $\geq 27\%$: $0,05 \pm 0,23$). Sin embargo, cuando la calidad fue OTAN, hubo más muestras con un IFE alterado (IFE <27%: $0,07 \pm 0,25$ vs IFE $\geq 27\%$: $0,36 \pm 0,49$). Estos datos fueron esperables, ya que, de acuerdo a lo encontrado en la bibliografía (117, 118), a peor calidad seminal peor estatus del ADN espermático.

De la misma manera, también se observaron diferencias significativas en los pacientes con la morfología alterada (común teratozoospermia), siendo éstos más numerosos cuando el IFE estuvo alterado (IFE < 27%: $0,38 \pm 0,49$ vs IFE $\geq 27\%$: $0,64 \pm 0,49$) (tabla 20).

Por el contrario, en pacientes no normozoospermicos no se observaron diferencias significativas, es decir, la media de pacientes con esta calidad seminal, fue estadísticamente similar cuando tuvieron un IFE normal o alterado (tabla 20).

Cuando el IFE se dividió en tres categorías para poder estudiar más detalladamente cómo se distribuía según los grupos de calidad seminal (figura 7), se pudo observar que, en los pacientes normozoospermicos fue más común que tuvieran un IFE <13%. Sin embargo, en los pacientes no normozoospermicos, lo más común fue que tuvieran un IFE entre 13-27% aunque, muy similar al IFE $\geq 27\%$. Por último, tanto los que tuvieron la morfología alterada como los OTAN, lo más usual fue que tuvieran el IFE alterado (tabla 21). De estos datos pudieron concluirse que en los pacientes con al menos algún parámetro alterado, se observó una tendencia a tener un IFE más elevado (figura 7).

A la vista de estos resultados, se pudo esperar que en pacientes con todos los parámetros seminales normales, la fragmentación también lo fuera y, en pacientes con todos los parámetros alterados (OTAN) o aquellos con morfología anormal, la fragmentación también lo estuviera. No obstante, no hay que olvidar que existieron pacientes con un IFE alterado y parámetros seminales normales y pacientes con un IFE normal y parámetros seminales alterados, tal y como también reportó el grupo de Evgeni (119).

DISCUSIÓN

Por esta razón, el análisis del semen mediante un seminograma básico fue una herramienta de diagnóstico con un valor predictivo limitado, ya que la información aportada no analizó la integridad del genoma masculino (79).

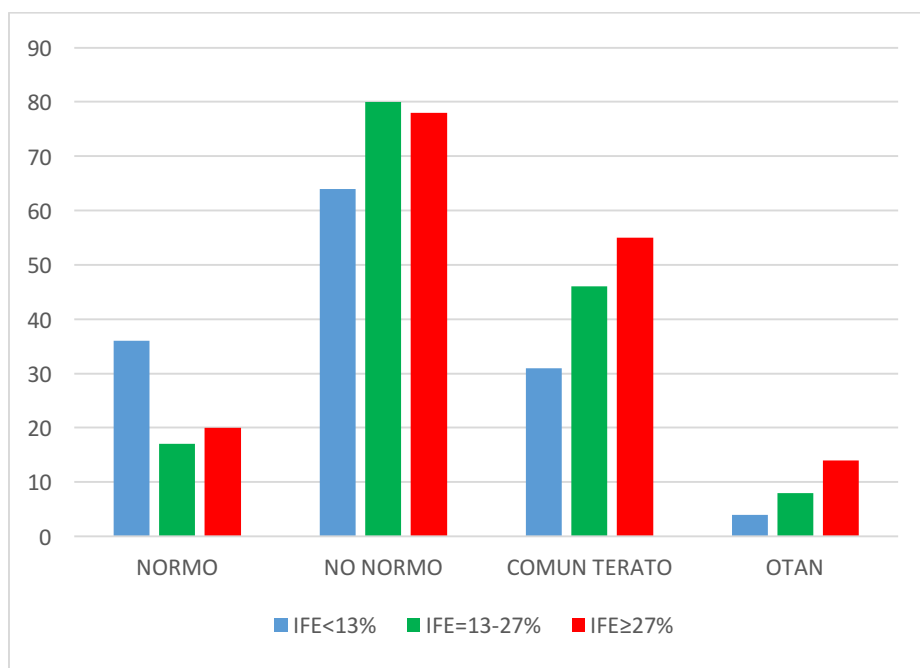


Figura 7: Distribución de las calidades seminales en función del IFE dividido en tres grupos.

Una integridad de la cromatina comprometida se vinculó con resultados fallidos en TRA (81, 117, 120, 121). Por tanto, los pacientes con parámetros seminales normales que tienen un IFE elevado, éste podría ser el problema de su infertilidad.

Como consecuencia y, según nuestros resultados, se podría justificar una evaluación exhaustiva de la infertilidad masculina que incluya un seminograma básico y una prueba de fragmentación del ADN espermático (IFE), en pacientes con seminogramas normales pero con ciclos de ICSI fallidos.

El mecanismo subyacente al problema de la fragmentación podría remontarse o bien a un defecto en el embalaje de la cromatina durante la espermatogénesis, o bien, a un daño producido tras ella (122).

DISCUSIÓN

En el primer caso se debe tener en cuenta que, a pesar de la eficacia de las histonas en la compactación del ADN, el espermatozoide haploide experimenta uno de los cambios más significativos conocidos en biología, donde la gran mayoría de histonas son sustituidas por protaminas, consiguiendo así, una mayor compactación del ADN. El componente principal de las protaminas es la arginina y, es el encargado de conseguir dicha supercompactación, neutralizando las cargas negativas de los grupos fosfato en la doble hélice de ADN (123).

Durante dicha compactación, se producen de forma natural roturas en la cadena de ADN inducidas por la topoisomerasa II, con el fin de aliviar las tensiones producidas por la sustitución de las histonas por las protaminas. Es decir, se producen roturas y, una vez que la cromatina se vuelve a condensar, estas roturas se vuelven a sellar. Esta sustitución consigue un empaquetamiento mucho más eficiente que probablemente evolucionó para facilitar la entrega segura del ADN paterno al ovocito.

Además, cabe destacar que, los espermatozoides se concentran y almacenan en el epidídimo y durante la eyaculación, se van mezclando con las secreciones de las glándulas sexuales accesorias. El número total de espermatozoides refleja la producción de este tipo de células en los testículos, aunque también es importante la permeabilidad del conducto postesticular y el fluido total aportado por las glándulas accesorias que revelan su actividad secretora. La motilidad espermática es esencial para que los espermatozoides atraviesen el moco cervical y puedan llegar a las trompas de Falopio y fecundar el óvulo.

Por tanto, si el daño del ADN surge únicamente del fracaso para reparar las roturas de la doble hélice sufridas durante la espermatogénesis, se podría esperar que el IFE se correlacionara con parámetros de fallo espermatogénico, como la oligozoospermia o teratozoospermia. Alternativamente, cuando el daño en el ADN tuvo lugar tras la espermatogénesis, éste se podría relacionar con una motilidad espermática alterada (124). Por consiguiente y, de acuerdo a nuestros datos, se pudo asumir una posible relación entre los parámetros seminales y el IFE.

En un segundo análisis, se tuvieron en cuenta los resultados tras la ICSI en función del IFE. Los resultados encontrados en la bibliografía en relación con este punto generan cierta ambigüedad.

Por un lado, algunos autores (77, 116, 125, 126) reportaron correlaciones negativas entre el IFE alterado y el desarrollo de los blastocistos. Otros autores, como Lopes (126), encontraron la correlación entre el IFE y la tasa de fecundación, aunque también hubo trabajos

DISCUSIÓN

que defendieron que, el daño espermático no necesariamente impide la fecundación y la formación de los pronúcleos, como el del grupo de Twigg (84).

Por otro lado, hay otros grupos de investigación (127, 128, 129, 130) que demostraron que se pueden conseguir embarazos evolutivos utilizando muestras seminales con un IFE alterado. Es más, se han encontrado estudios como el de Erenpreiss (117) y el de Bungum (128) que apoyan que, el IFE fue menos predictivo cuando se realizó una ICSI que una FIV convencional.

Cabe destacar que, de forma natural, la integridad de la cromatina de los espermatozoides es esencial para evitar la formación de un embrión no viable. Sin embargo, la técnica de ICSI permite que, incluso los espermatozoides de muy baja calidad inicien un embarazo exitoso que, de forma natural no lo conseguirían.

Teniendo en cuenta dichas premisas, en el segundo análisis estadístico llevado a cabo en este apartado, se estudió como afectó el IFE a las variables consideradas en los dos bloques de estudio para los dos grupos de pacientes: ovocitos propios y recepción de ovocitos.

En el grupo de pacientes con ovocitos propios, también se quiso estudiar como afectó la edad materna, dividiéndose en menores y mayores de 35 años.

Según la tabla 22, cuando el IFE fue normal, no se encontraron diferencias significativas entre ser menor o mayor de 35 años en el número de ovocitos, tasa de fecundación, número de embriones en día +3, tasa de llegada a blastocisto, de gestación clínica, aborto o gestación evolutiva (figuras 8 y 9).

Al contrario, cuando el IFE estuvo alterado, únicamente se encontraron diferencias significativas en el número de ovocitos obtenidos, siendo éste mayor en el grupo de pacientes mayores de 35 años. Mientras que, en las demás variables no se observaron tales diferencias.

Estos datos pudieron indicarnos que el IFE no se vio influido por el factor etario, obteniendo resultados muy similares en ambos grupos de edad.

En contraste, cuando se comparó el IFE (normal vs alterado) dentro del mismo grupo de edad, se observó que hubo diferencias significativas en el número de ovocitos dentro del grupo de mayores de 35 años, aunque este resultado podría deberse al pequeño tamaño muestral (N) del grupo con IFE alterado (N= 8). Consecuentemente, se observaron también diferencias significativas en el número de embriones en día +3 en este grupo de pacientes, estando de

DISCUSIÓN

acuerdo con el resultado anterior: cuando se contó con un mayor número de ovocitos para microinyectar, se consiguió un mayor número de embriones en día +3.

Por último, se observaron diferencias significativas en la tasa de gestación clínica en pacientes menores de 35 años, siendo ésta inesperadamente mayor cuando el IFE estuvo alterado (IFE <27%: 25% vs IFE ≥27%: 60%) (figura 9). Este resultado podría justificarse si tenemos en cuenta que el tamaño muestral de los pacientes pertenecientes a este grupo fue muy limitado (N= 10) y, este hecho se debió de tener en cuenta a la hora de validar dicho resultado (tabla 22).

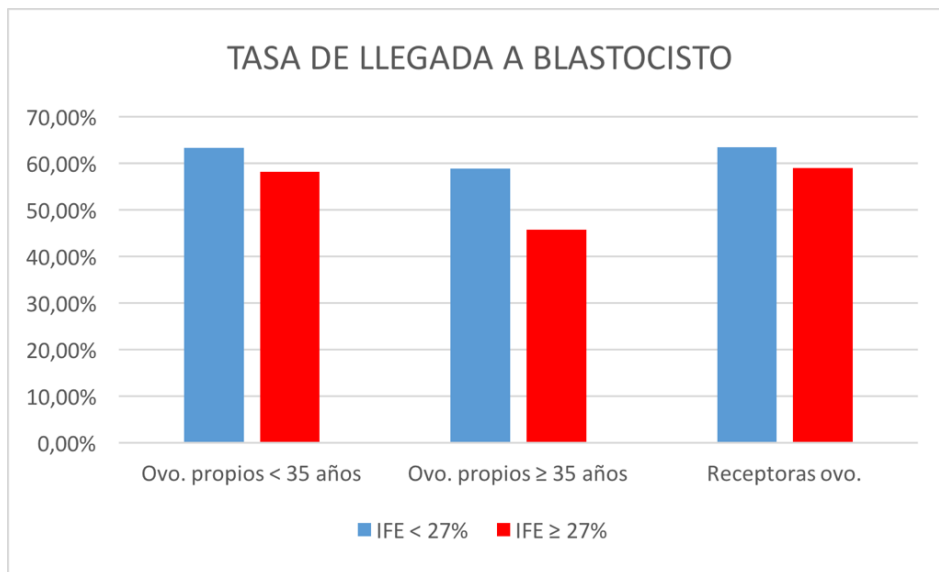


Figura 8: Distribución del IFE entre los grupos de estudio para la tasa de llegada a blastocisto.

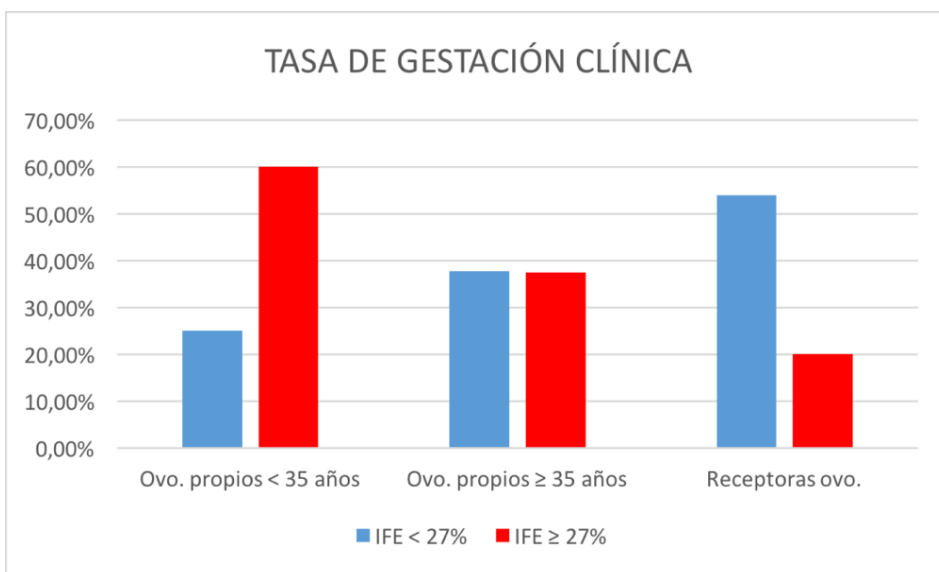


Figura 9: Distribución del IFE entre los grupos de estudio para la tasa de gestación clínica.

DISCUSIÓN

Se han encontrado estudios de acuerdo con nuestros datos, donde postulan que el daño del ADN no parece tener un impacto significativo sobre los resultados del ciclo (117, 123). Esta hipótesis podría ser justificada por la mejora en el procesamiento de las muestras seminales (capacitación y *swim-up*) que se usaron para microinyectar los ovocitos.

Durante la capacitación espermática, las muestras seminales tras la centrifugación con gradientes de densidad se enriquecieron con espermatozoides morfológicamente normales y con una integridad nuclear mejorada.

De esta manera, según el grupo de Rougier (131), el IFE disminuyó significativamente después del paso por los gradientes. Por esta razón, el método de preparación seminal antes de la ICSI, podría mejorar los niveles de fragmentación y podría explicar los resultados obtenidos.

Como ya se ha mencionado anteriormente, hay numerosos estudios (77, 116, 126, 132, 133, 134) que correlacionaron negativamente el IFE con bajas tasas de fecundación, de llegada a blastocisto, de calidad embrionaria, de implantación y gestación evolutiva, elevadas tasas de aborto y mayor riesgo de defectos congénitos. Sin embargo, según nuestros datos, la tasa de aborto, tendió a ser mayor en el grupo con IFE alterado, aunque no de forma significativa (tabla 22).

Cuando el análisis estadístico se realizó en el grupo de receptoras de ovocitos (tabla 23), donde el ovocito fue joven, sano y sin problemas de fertilidad, únicamente se encontraron diferencias significativas en la tasa de gestación clínica, siendo ésta mayor cuando el IFE fue normal (IFE <27%: 54% vs IFE ≥27%: 20%) (figuras 8 y 9). Este resultado estuvo de acuerdo con aquellos estudios anteriormente señalados donde correlacionaban negativamente el IFE con las tasas de gestación (77, 116, 126, 132, 133, 134).

En este grupo de pacientes, también se observaron diferencias significativas en el tipo de blastocisto formado, encontrándose un mayor número de embriones de tipo eclosión cuando el IFE fue normal (IFE <27%: $0,71 \pm 0,84$ vs IFE ≥27%: $0,15 \pm 0,55$). Sin embargo, en el grupo con IFE alterado, el número de embriones que se transfirieron de tipo cavitando, (blastocistos menos evolucionados) fue significativamente mayor (IFE <27%: 0 vs IFE ≥27%: $0,10 \pm 0,32$). Estos datos también apoyaron los estudios cuyos resultados correlacionaron negativamente el IFE con la calidad embrionaria (77, 126, 132).

Por tanto y según nuestros datos, cuando el IFE fue normal, la tasa de gestación clínica fue significativamente mayor en las receptoras de ovocitos. Sin embargo, cuando el IFE estuvo

DISCUSIÓN

alterado y, aunque la tasa de llegada a blastocisto fue muy similar cuando IFE estuvo normal, el ovocito no fue capaz de reparar el daño espermático y la tasa de gestación clínica se vio estadísticamente disminuida.

Además, hubo que tener en cuenta que, la activación del genoma embrionario ocurre a partir de día +3 (17), lo que sugiere que el genoma paterno puede no ser necesario hasta esa etapa, pudiendo deducirse que un IFE elevado pudo ser más relevante en las últimas etapas del desarrollo embrionario que en las más iniciales. Esta premisa se vio apoyada por el hecho de no haber encontrado diferencias significativas en la tasa de llegada a blastocisto pero sí en la de gestación clínica para el grupo de receptoras de ovocitos. Este acontecimiento nos pudo llevar a suponer que, el efecto de la fragmentación espermática pueda manifestarse más allá del estado de blastocisto, pudiendo explicar la alta tasa de aborto encontrada en la bibliografía.

Por esta razón, los pacientes con el IFE alterado no se verán más beneficiados del cultivo largo que los pacientes con el IFE normal, tan solo se verán beneficiados por las ventajas que confiere por sí solo el cultivo largo, sin tener en cuenta este parámetro seminal.

Tal y como se puede comprobar, la relación entre el IFE y la consecución del embarazo sigue siendo controvertida. Por ello, nuestro estudio también quiso analizar el valor predictivo de este parámetro seminal (IFE) mediante modelos de regresión logística binaria (tablas 27-29).

Tras el análisis de los resultados obtenidos, no se observó ningún resultado significativo en los grupos de pacientes estudiados (receptoras de ovocitos y ovocitos propios), aunque sí una ligera tendencia en la consecución de la gestación clínica en el grupo de pacientes con ovocitos propios ($p = 0,05$; $p = 0,06$) (tablas 27 y 28).

Estos resultados difieren del metanálisis realizado por el grupo de Evenson (135), donde concluía que las parejas tenían 1,6 veces más probabilidades de conseguir el embarazo cuando el IFE era normal. Sin embargo, nuestros datos sí estuvieron de acuerdo con el metanálisis llevado a cabo por Zhang (136), donde no fueron capaces de confirmar el valor predictivo del IFE, al igual que nosotros. Por tanto, el análisis del IFE de forma rutinaria para evaluar la fertilidad masculina sigue siendo un tema muy cuestionado (64, 117).

Como conclusión se podría exponer que, la integridad de la cromatina espermática es esencial para los espermatozoides. Además, se trata de una medida que en algunos casos es independiente de la calidad seminal y puede proporcionarnos información diagnóstica y pronóstica complementario, pero distinta, de la obtenida de un seminograma.

DISCUSIÓN

Aunque, a pesar de tener en cuenta tales premisas, los datos analizados en nuestro estudio, no permiten recomendar el IFE como una prueba de rutina añadida en todos los pacientes, porque parece que los métodos de capacitación y la técnica ICSI, hacen superar las barreras naturales de los espermatozoides con el ADN dañado que no serían capaces de conseguir una fecundación exitosa en circunstancias naturales.

Únicamente en pacientes normozoospermicos con ciclos de ICSI fallidos, podríamos encontrar en el IFE el problema reproductivo de dichos pacientes y proponerles medidas correctivas. Sin embargo, los resultados mencionados anteriormente deberían ser apoyados por estudios más completos.

4. EVALUAR SI LAS CALIDADES EMBRIONARIAS PROPUESTAS EN DÍA +3 DE DESARROLLO PUEDEN PRONOSTICAR LAS CALIDADES EN DÍA +5.

Un aspecto clave en los TRA es la evaluación de los embriones generados *in vitro* para identificar cuáles son los que tienen mayores probabilidades de generar un embarazo viable. Desde hace algún tiempo se ha propuesto el cultivo de blastocistos para aumentar la eficacia de dichos tratamientos, mejorando así la selección de los embriones con mejores probabilidades de implantación (58). Los recientes avances en los medios de cultivo, diseñados para cubrir las necesidades cambiantes del embrión a medida que se desarrolla y diferencia, tuvieron como resultado final la formación de blastocistos de alta viabilidad (18). Este hecho, ha incitado a muchas clínicas a posponer la transferencia embrionaria a día +5 de desarrollo (28, 137, 138).

A pesar de haber conseguido mejoras en los resultados, la capacidad para predecir el potencial de implantación de un embrión sigue siendo compleja. De hecho, incluso los embriones seleccionados con mejores criterios morfológicos, no siempre fueron capaces de dar un embarazo evolutivo que culminara con un recién nacido vivo.

Por tanto, la información aportada por el cultivo largo mejora la selección de aquellos embriones más viables y genéticamente normales, aunque el cultivo de blastocistos no es una garantía de normalidad cromosómica. Se ha reportado que la mayoría de los embriones que no llegaron a blastocisto mostraron aneuploidías múltiples (139). Por tanto, prolongar el cultivo embrionario hasta el día +5 pudo permitir que los embriones cromosómicamente normales se desarrollen hasta dicho estadio aumentando así, la probabilidad de identificar embriones euploides y competentes para transferir (140). Esto se debe a que la fisiología embrionaria

DISCUSIÓN

verdadera se evalúa a partir de día +3 y, antes de esta etapa, la fisiología del embrión refleja la del ovocito (17).

Hoy en día, la decisión de realizar la transferencia en día +5 en vez de en día +3 sigue siendo un tema muy debatido, planteándonos las siguientes preguntas: ¿qué tipos de pacientes se verán beneficiados de las transferencias en día +5? y, ¿el hecho de prolongar la duración del cultivo *in vitro* 48 h más, podría comprometer el potencial de implantación de los embriones?.

Según la bibliografía, se encontraron grupos de trabajo que describieron aumentos en las tasas de implantación y gestación evolutiva (141, 142, 143, 144) con las transferencias en día +5 y estudios, donde no hubo mejoría, como el de Bungum (145).

Concretamente, el estudio llevado a cabo por el grupo de Racowsky (142) mostró que, las transferencias en día +5 fueron beneficiosas únicamente los para pacientes con buen número de embriones en día +3 (tres o más embriones con ocho células), los pacientes con embriones de calidades intermedias (uno o dos embriones con ocho células) tuvieron un beneficio dudoso y, los pacientes con embriones de mala calidad (ningún embrión con ocho células) no se vieron beneficiadas del cultivo largo en ningún caso. Los resultados de este análisis mostraron que, considerar el número de embriones con ocho células en día +3, proporcionó un criterio apropiado para la identificación prospectiva del día óptimo de transferencia. De hecho, no se observó parada embrionaria desde día +3 a +5 cuando hubo tres o más embriones con ocho células (142).

En nuestro centro, la decisión de transferir en día +5 en vez de en +3, pudo venir propuesta desde el principio del ciclo a petición de los pacientes o, pudo ser tomada en día +3 por recomendación del embriólogo. En el segundo caso, los embriólogos chequean y evalúan los embriones en día +3 atribuyéndoles una calidad (12) y, en función del número de embriones y la calidad propuesta, se recomienda a los pacientes transferir en día +3 o +5. Por este hecho, fue importante estudiar hasta qué punto las calidades propuestas en día +3 fueron determinantes para tomar dicha decisión y si éstas pudieron pronosticar las calidades en día +5.

Según nuestros datos (tabla 30), dentro del grupo de pacientes que usaron sus propios ovocitos, el 35,85% de los embriones que fueron de categoría A en día +3, tuvieron la misma categoría en día +5. Mientras que, el 41,70% de los embriones de categoría B en día +3, también lo fueron en día +5, el 51,43% de los embriones de categoría C en día +3, también lo fueron en día +5 y, por último, el 20% de los embriones de categoría D, también lo fueron en día +5.

DISCUSIÓN

En las receptoras de ovocitos, el 40,14% de los embriones de categoría A en día +3, también lo fueron en día +5, el 50,49% de categoría B en día +3, también lo fueron en día +5, el 46,08% de categoría C en día +3, también lo fueron en día +5 y, por último, no hubo ningún embrión de calidad D en día +5 en este grupo (tabla 30).

Estos datos nos hacen suponer que no todas calidades que se proponen en día +3, se van a mantener en día +5, sobretodo en el grupo de pacientes con ovocitos propios, pudiendo cuestionar el valor pronóstico de las calidades propuestas en día +3.

Sin embargo, cuando se estudió estadísticamente si la media de embriones de categoría A, B, C o D en día +3 era similar a la encontrada en día +5, se observó que la media fue similar en todas categorías excepto en el grupo de ovocitos propios cuando los embriones fueron de categoría D. En este caso, la media de estos embriones (D) fue mayor en día +3 que en día +5, es decir, hubo más embriones de dicha categoría en día +3 que en día +5. Esto pudo ser debido a que, una vez tomada la decisión de llevar a cultivo largo un ciclo en día +3, se dejan todos los embriones en cultivo, incluso los que de categoría D.

Por tanto, las calidades embrionarias propuestas en día +3, no pronosticaron las calidades de día +5 como tales, aunque la media de embriones de cada calidad si se mantuvo similar en día +5.

Para analizar el valor pronóstico de dichas calidades, el análisis estadístico que se llevo a cabo en este apartado se realizó a través de modelos de regresión logística binarios (tablas 31-35).

De esta manera, en el grupo de receptoras de ovocitos se observó que, tener embriones de calidad A y B en día +5 fue estadísticamente un valor predictivo en la consecución de la gestación clínica (variable dependiente). Es decir, el hecho de que este grupo de pacientes tenga embriones de calidad A y B el día de su transferencia (+5), dobló las posibilidades de gestación (OR= 1,75 y OR= 2,09 respectivamente). Sin embargo, tener embriones de tipo blastocisto temprano o mórula compacta, tuvo una asociación negativa con la consecución del embarazo (tabla 31).

Los modelos de regresión logística también se calcularon para determinar la probabilidad de llegada a blastocisto de al menos el 60% de los embriones de día +3 (variable dependiente). En este caso, tener embriones en día +3 de calidad D, tuvo una asociación negativa con variable dependiente, siendo la mitad de probable que lleguen al menos el 60% de

DISCUSIÓN

los embriones a blastocisto. Por el contrario, cuando los embriones que se transfirieron en día +5, en día +3 se categorizaron con calidad B, fue 1,65 veces más probable que llegaran a blastocisto (tabla 32). Estos datos nos hacen suponer que los embriones con mejores calidades en día +3, son los que posteriormente se convertirán en blastocistos y darán lugar a un embarazo viable, y los embriones de peor calidad (D) no lo harán, en concordancia a lo encontrado en la bibliografía (138, 146, 147).

Por tanto, en el grupo de las receptoras de ovocitos, las calidades propuestas en día +3 (sobre todo la calidad B y D) sí pronosticaron los resultados en día +5 pero no la consecución de la gestación clínica. Sin embargo, las calidades propuestas en día +5 (A y B) si fueron capaces de pronosticar la consecución del embarazo. Por tanto, este grupo de pacientes se vio más beneficiado de las transferencias en día +5 que en día +3 (imagen 24).

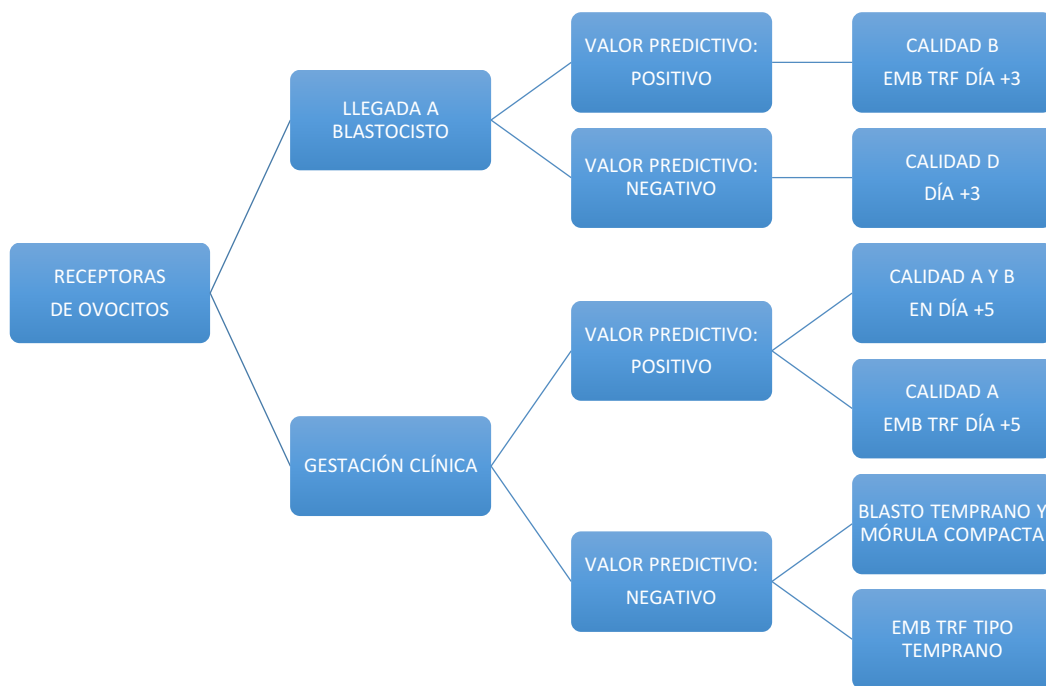


Imagen 24: Diagrama de flujo explicativo del valor predictivo en los pacientes receptoras de ovocitos.

Cuando los modelos de regresión se calcularon para las pacientes con ovocitos propios (imagen 24), inesperadamente se observó que cuando la edad materna fue menor de 35 años, los embriones que transferimos en día +5 y que categorizamos en día +3 con calidad C, tuvieron una asociación positiva en la consecución de la gestación (tabla 33). Es decir, si estas pacientes se transfirieron embriones en día +5 que fueron de calidad C en día +3, tuvieron casi 5 veces más

DISCUSIÓN

probabilidad de conseguir una gestación clínica. En este caso, la calidad C en día +3, sí fue capaz de pronosticar la gestación clínica pero no los resultados en día +5.

Este resultado es muy interesante a la hora de recomendar o no hacer cultivo largo teniendo en cuenta únicamente el número y calidad de los embriones en día +3. Si el hecho de tener calidades intermedias en día +3, nos suscitaba cierto temor a que la tasa de llegada a blastocisto fuera menor, este resultado podría resultar tranquilizador y nos permitiría dejar los embriones a cultivo largo con más confianza.

A la vista de estos resultados, este grupo de pacientes no tuvo ninguna asociación estadística con las calidades propuestas en día +5, por tanto, el cultivo largo no fue tan determinante como en otros grupos de pacientes a la hora de seleccionar el embrión con mayor potencial de implantación para transferir. Una posible justificación a estos resultados se pudo basar en que estas pacientes, fueron mujeres reproductivamente jóvenes que tuvieron mejor pronóstico que las mujeres mayores de 35 años y, tal y como hemos observado en nuestros resultados, la tasa de llegada a blastocisto fue mayor. Por tanto, el margen de error sería menor al seleccionar un embrión para transferir en día +3 que posteriormente no llegase a blastocisto.

Por el contrario, cuando las pacientes con ovocitos propios tuvieron más de 35 años, se observó una asociación positiva de los embriones de calidad B en día +3 (OR= 6,70), de los embriones de calidad A en día +5 (OR= 3,46) y de los embriones de calidad A que se transfirieron ese mismo día (+5) (OR= 3,47) en la consecución de la gestación clínica. Por el contrario, se observó una asociación negativa cuando los embriones fueron de calidad C en día +5 y cuando se transfirieron embriones de dicha calidad (OR= 0,32 y OR= 0,46) (tabla 34).

Según estos datos, se pudo plantear que en este grupo de pacientes, las calidades propuestas en día +5 tuvieron mayor valor predictivo que las propuestas en día +3, por tanto, estas pacientes podrían verse beneficiadas del cultivo largo y así poder seleccionar los embriones con mejores calidades en día +5, puesto que serán los consiguen el embarazo. Aunque, cabe destacar que, según nuestros datos, los pacientes con embriones de calidad B en día +3, también tuvieron un valor pronóstico significativo a la hora de conseguir la gestación.

Cuando la variable a estudiar fue la llegada a blastocisto de al menos el 60% de los embriones de día +3, vimos que los embriones de calidad D tuvieron una asociación estadísticamente negativa, pudiéndose suponer que los embriones con dicha calidad, no van a ser los que lleguen a blastocisto (tabla 35). Por tanto, las calidades propuestas en día +3 (A, B o C) no fueron estadísticamente capaces de pronosticar los resultados en día +5 y, únicamente, la

DISCUSIÓN

calidad B fue capaz de pronosticar la gestación clínica (imagen 25). Por tanto, este grupo de pacientes no se vio beneficiado de las transferencias embrionarias en día +3.

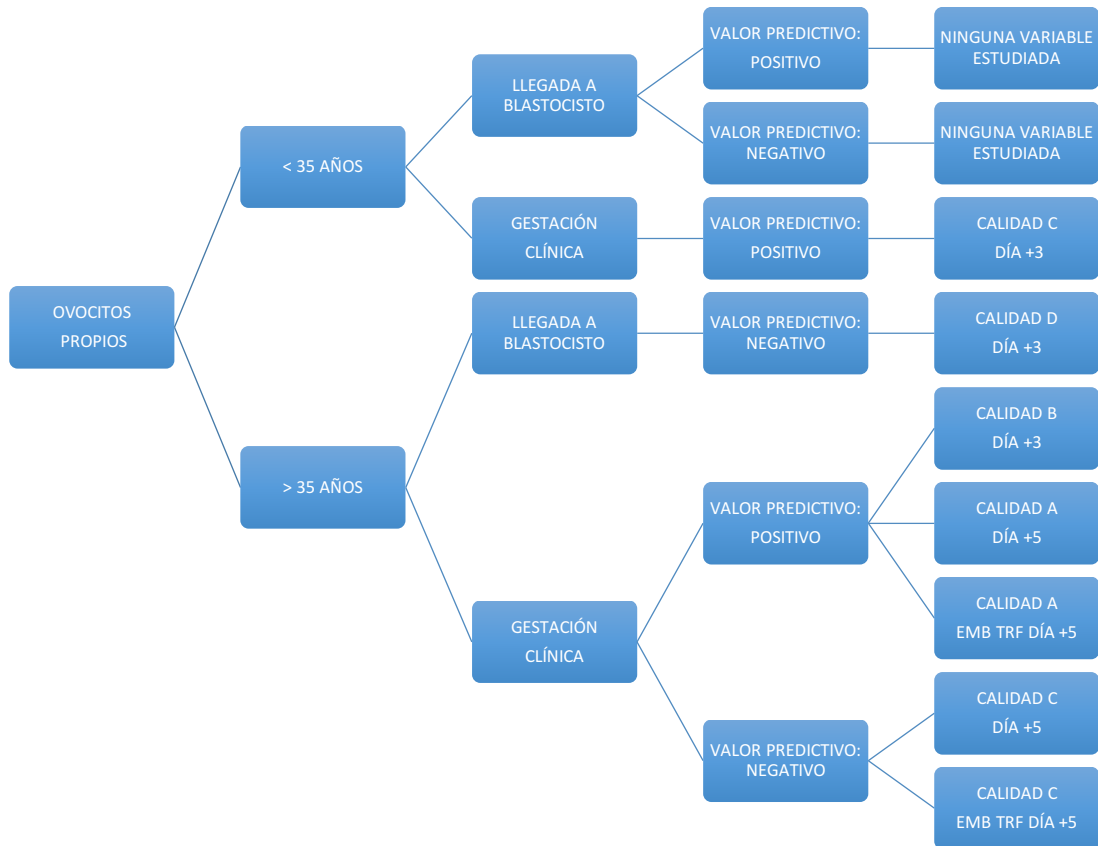


Imagen 25: Diagrama de flujo explicativo del valor predictivo en los pacientes con ovocitos propios.

Por tanto, las calidades en día +3 fueron importantes aunque no tan determinantes como se pensaba, sobretodo para las pacientes con ovocitos propios mayores de 35 años y las receptoras de ovocitos. Dichas calidades nos dieron una idea de cómo iba el ciclo y, en el caso de las receptoras de ovocitos, nos pronosticaron los resultados en día +5, pero si tuvimos embriones de calidad A, B o C en día +3, fue estadísticamente más beneficioso dejarlos en cultivo hasta blastocisto y únicamente contar, con aquellos embriones que fueron capaces de llegar y seleccionar el embrión con mayor potencial de implantación.

Con el fin de corroborar dichas premisas, se compararon las calidades propuestas en día +3 y +5 mediante modelos de curvas ROC para la consecución de la gestación clínica.

Tras analizar los resultados se observó que, en las receptoras de ovocitos, únicamente las calidades A y B en día +5 tuvieron un resultado significativo. Este resultado corrobora que las

DISCUSIÓN

calidades propuestas en día +5 fueran clínicamente más determinantes que las propuestas en día +3 (figura 3 y tabla 36).

De la misma manera, cuando la comparación se hizo en pacientes con ovocitos propios menores de 35 años, la única calidad con valor predictivo fue la C en día +3 (figura 4 y tabla 37). Este resultado nos hace plantearnos que en este grupo de pacientes, las calidades propuestas en día +5 no fueran tan determinantes como en otros grupos de pacientes, corroborando los análisis de regresión expuestos anteriormente (tabla 33).

Estas pacientes tienen ovocitos todavía jóvenes, que pueden reparar las alteraciones seminales mejor que los ovocitos de edad más avanzada. Por tanto, en este grupo de pacientes el cultivo largo no fue tan indispensable como en otros grupos, porque si el problema de estas pacientes fue masculino, la ICSI lo solucionó. Además, el margen de error al seleccionar un embrión en día +3 que posteriormente no llegará a día +5, fue menor.

Por el contrario, cuando las pacientes con ovocitos propios tuvieron más de 35 años, las calidades A y B propuestas en día +5, volvieron a tener un valor predictivo estadísticamente significativo frente a las propuestas en +3 (figura 5 y tabla 38). Este resultado apoya la hipótesis de que las calidades propuestas en día +5 fueron más determinantes que las calidades en día +3. Por tanto, en este grupo de pacientes fue importante realizar el cultivo largo para poder seleccionar más acertadamente que en día +3, los blastocistos con mejor calidad (A y B) que consecuentemente, tendrán un mayor potencial de implantación.

Por tanto, el mayor grado de diferenciación celular de los blastocistos y, el hecho de que el genoma embrionario comience a funcionar a partir de día +3, sugiere que las características de dicho estadio puedan ser más útiles para evaluar la viabilidad de los embriones que las características evaluadas en día +3. La ventaja más importante fue el hecho de valorar el embrión propiamente dicho (30), mientras que hasta día +3 principalmente fue competencia de los ovocitos (20, 22).

5. EVALUAR QUÉ TIPO DE PACIENTES SE VEN BENEFICIADOS AL REALIZAR CULTIVO LARGO.

Por un lado, los embriones que fueron capaces de llegar hasta día +5 fueron embriones que por sí solos no pudieron evolucionar mucho más, ya que necesitaron el endometrio materno para proseguir su evolución.

DISCUSIÓN

Por otro lado, sabemos que no todos los embriones de día +3 fueron capaces de llegar a dicho estadio, lo que implicó una disminución del número total de embriones viables en día +5, algunos embriones cromosómicamente anormales o incapaces de activar su genoma no se desarrollaron hasta blastocisto.

Además, se ha demostrado que la transferencia de blastocistos en día +5, coincide con la entrada de los embriones a la cavidad uterina en el ciclo natural, consiguiendo de esta manera, una mejor sincronía entre el endometrio y el embrión.

Por tanto, el principal objetivo del cultivo largo fue: aumentar la tasa de éxito mejorando la selección embrionaria, seleccionando aquellos embriones más viables de la cohorte, con la consiguiente reducción del número de embriones a transferir, disminuyendo a su vez, la incidencia de gestaciones múltiples.

Según nuestros datos, se pudo confirmar que el grupo de receptoras de ovocitos y de ovocitos propios mayores de 35 años se vieron estadísticamente beneficiadas del cultivo largo.

Los primeros, porque se seleccionó el mejor/es embrión/es para transferir de todos los que llegaron hasta día +5, pudiendo transferir los embriones con las mejores calidades (A y B) de la cohorte que se tuvo con el fin de maximizar las probabilidades de gestación evolutiva.

Los segundos, porque no todos los embriones fueron capaces de llegar a blastocisto debido a su factor etario, de esta manera, se transfirieron únicamente aquellos que sí fueron capaces de llegar, es decir, aquellos que activaron su genoma embrionario y formaron un blastocisto, maximizando así, la consecución de un embarazo viable.

En este grupo de pacientes cuyos ovocitos fueron propios y tuvieron más de 35 años, se calcularon curvas ROC cuando consiguieron blastocistos de tipo eclosión y expandido. Los resultados de estas curvas, nos permitieron observar un valor predictivo significativo a la hora de conseguir la gestación clínica.

Por ello, con más motivo, este grupo de pacientes se benefició del cultivo largo y, si además consiguió que sus blastocistos fueran de tipo eclosión y expandido, la probabilidad de gestación clínica fue más alta. El área bajo la curva ROC fue de 0,67 y el modelo tuvo una sensibilidad del 96% con una especificidad del 85% (tabla 39 y figura 6).

Sin embargo, las pacientes con ovocitos propios menores de 35 años, no se vieron estadísticamente más beneficiadas por el cultivo largo que por la transferencia en día +3. Estas

DISCUSIÓN

pacientes fueron pacientes con problemas tubáricos o de factor masculino, que tras la ICSI pudo solventarse. El cultivo largo en estas pacientes tampoco fue perjudicial, simplemente no les confirió un beneficio adicional al que ya tiene de por sí. Con el cultivo largo, se tuvo más información y se pudo realizar una selección más acertada que en día +3 aunque sin un respaldo estadístico, según nuestros resultados.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Cada día es más frecuente observar la tendencia a retrasar la maternidad en nuestra sociedad. Este retraso está ocasionándonos problemas reproductivos ya que, sociológicamente no hemos evolucionado a la par que biológicamente. La edad materna es muy importante cuando hablamos de fertilidad y parece que no le estamos dando la importancia que realmente tiene.

Según nuestros resultados, hemos podido concluir que, la calidad ovocitaria puede pronosticar mejor los resultados de un TRA que la calidad seminal ya que, el ovocito tiene una capacidad reparadora capaz de ayudar a paliar las calidades seminales más alteradas.

Por ello, aquellas pacientes jóvenes que han sufrido ciclos de ICSI fallidos, posiblemente su problema reproductivo radique más en los ovocitos que en los espermatozoides y, la recomendación más acertada sería la ovodonación.

Cuando se lleva a cabo un TRA con ICSI, sabemos que no todos los ovocitos que obtenemos van a estar biológicamente preparados para dar lugar a un embarazo viable. Por esta razón la posibilidad de poder hacer una criba y seleccionar solo aquellos embriones más evolucionados de todos los que tenemos, podría ahorrar transferencias con resultados negativos.

Por tanto, por un lado, el cultivo largo nos proporciona esa información extra para mejorar la selección del mejor embrión/es para transferir. El blastocisto que se forma gracias al cultivo largo, es un embrión que por sí solo no puede seguir evolucionando mucho más, necesita el endometrio materno para continuar con su desarrollo y, desde el punto de vista de un embriólogo, es un éxito poder transferir este tipo de embriones.

Por otro lado, el cultivo largo puede suscitaros cierto temor por la posibilidad de que no llegue ningún embrión a dicho estadio o que lleguen muy pocos. Pero el hecho de que no

DISCUSIÓN

llegue ningún embrión, es información para los pacientes, son transferencias que se ahorrarían y, si llegan pocos embriones, esos serán los que tienen mayores posibilidades de implantación.

Por tales razones, el cultivo largo es una buena elección, sobre todo en pacientes que no deben desaprovechar el tiempo, es decir, aquellas pacientes que por su edad, deben ir a lo seguro, a las transferencias de embriones con el genoma activado.

Por ello, el cultivo largo se irá implantando cada vez más en nuestros protocolos, consiguiendo de esta manera, la transferencia de los embriones más evolucionados de la cohorte y una mejor sincronía endometrial.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En nuestro estudio, donde se valoró la influencia del factor femenino y masculino en la llegada al estadio de blastocisto y en la consecución del embarazo, presentamos las siguientes conclusiones:

1. Según nuestros datos, el origen de los ovocitos (donados o propios) tuvo mayor valor predictivo que la calidad seminal cuando se realizó una ICSI.
2. Nuestros resultados avalan que, los ovocitos de las pacientes menores de 30 años fueron capaces de soportar calidades seminales no normozoospermicas, obteniendo unas tasas de gestación clínica y evolutiva estadísticamente superiores del resto de grupos de edad. A partir de dicha edad, las tasas se vieron disminuidas. Esta observación, nos hace plantearnos que pueda existir un posible efecto reparador en el ovocito.
3. Tras obtener estos resultados se sugiere que, los pacientes con ovocitos propios mayores de 35 años y las receptoras de ovocitos, pueden beneficiarse del cultivo a blastocisto. Para ambos grupos de pacientes las calidades embrionarias propuestas en día +5 tuvieron mayor valor predictivo que las calidades en día +3 para la consecución del embarazo. El cultivo largo aportó la información necesaria para poder transferir aquellos embriones más evolucionados de la cohorte del ciclo apoyándose en el supuesto de que, únicamente aquellos embriones capaces de activar su genoma y llegar a dicho estadio, fueron los que tuvieron un mayor potencial de implantación.
4. Según nuestros resultados, el cultivo a blastocisto toma mayor valor pronóstico en el grupo de pacientes con ovocitos propios, mayores de 40 años y con muestras seminales normozoospermicas. El cultivo largo aumentó su tasa de gestación clínica y evolutiva a pesar de su factor etario, optimizando la selección de embriones.
5. Sin embargo, tras analizar nuestros datos se puede deducir que, a las pacientes con ovocitos propios menores de 35 años, el cultivo largo no les confirió un beneficio adicional al que ya tiene de por sí: tener mayor información para realizar una selección embrionaria más acertada que en día +3.

CONCLUSIONES

6. Según nuestro estudio, cuando las pacientes con ovocitos propios mayores de 35 años, fueron capaces de formar blastocistos de tipo eclosión y expandido según la clasificación morfológica vigente, sus posibilidades de embarazo se maximizaron estadísticamente.
7. A pesar de que hubo pacientes normozoopérmicos con IFE alterado y pacientes no normozoospérmicos con IFE normal, los datos analizados no permiten recomendar el IFE como una prueba de rutina añadida para todos los pacientes, ya que los métodos de capacitación y la técnica ICSI, tienden a reducir el número de espermatozoides con IFE alterado. Únicamente sería aconsejable en pacientes normozoospérmicos con ciclos previos fallidos de ICSI.
8. Tal y como muestran nuestros resultados, el hecho de no haber encontrado diferencias significativas en la tasa de llegada a blastocisto pero sí en la de gestación clínica en pacientes con un IFE alterado, nos lleva a suponer que el efecto de la fragmentación espermática se manifieste más allá del estadio de blastocisto, pudiendo explicar la alta tasa de aborto característica de los pacientes con IFE alterado. Por tanto, estos pacientes no se verán más beneficiados del cultivo largo que otros pacientes con un IFE normal.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

Relación de abreviaturas y acrónimos que aparecen en texto. En muchos casos se ha conservado la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.

a.C.: Antes de Cristo

ACO: anticonceptivo oral.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNmit: ácido desoxirribonucleico mitocondrial.

AMH: hormona antimulleriana.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

ASEBIR: Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción.

ATP: adenosín trifosfato.

CCOO: complejos cúmulo-corona-ovocito.

CO₂: dióxido de carbono.

CP: corpúsculo polar.

CPN: cuerpos precursores de los nucléolos.

DGP: diagnóstico genético preimplantacional.

ES: solución de equilibrio.

FIV: fecundación *in vitro*.

FSH: hormona folículo estimulante.

FSHr: hormona folículo estimulante recombinante.

GnRH: hormona liberadora de gonadotropina (del inglés *gonadotropin releasing hormone*).

H: horas.

HBV: virus de la hepatitis B (del inglés *hepatitis B virus*).

hCG: gonadotropina coriónica humana.

HCV: virus de la hepatitis C (del inglés *hepatitis C virus*).

HIV: virus de inmunodeficiencia humano (del inglés *human immunodeficiency virus*).

hMG: gonadotropina menopáusica humana.

hPG: gonadotropina pituitaria humana.

ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides.

IFE: índice de fragmentación del ADN del espermático.

IMC: índice de masa corporal.

ABREVIATURAS

- Inf.:** inferior.
- LCF:** latido cardíaco fetal.
- LH:** hormona luteinizante.
- MCI:** células de la masa celular interna.
- mg:** miligramo.
- MI:** metafase I.
- MII:** metafase II.
- ml:** mililitro.
- mm:** milímetro.
- millones/mil:** millones por mililitro.
- N:** tamaño muestral.
- N₂:** nitrógeno.
- nm:** nanómetros.
- NS:** diferencias estadísticamente no significativas.
- O₂:** oxígeno.
- °C:** grados centígrados.
- OMS:** Organización mundial de la salud.
- OR:** del inglés *Odds ratio*.
- OTAN:** oligo-terato-asteno-necrozoospermia.
- p:** p-valor o nivel de significación.
- PCOS:** ovarios poliquísticos.
- pH:** "*pondus Hydrogenium*".
- P-I:** Profase-I.
- PN:** pronúcleos.
- PR:** movimiento espermático tipo progresivo.
- NPR:** movimiento espermático tipo no progresivo.
- PVP:** polyvinylpyrrolidona.
- RA:** reproducción asistida.
- RFA:** recuento de folículos antrales.
- RH:** factor *Rhesus*.
- ROC:** del inglés *receiver operating characteristic curve*.
- ROS:** especies reactivas de oxígeno.
- rpm:** revoluciones por minuto.
- SG:** saco gestacional.

ABREVIATURAS

SHO: síndrome de hiperestimulación ovárica.

SPSS: del inglés *statistical package for the social sciences*.

Sup.: superior.

TE: células del trofoectodermo.

TRA: tratamientos de reproducción asistida.

TRF: transferencia.

VG: Vesícula germinal.

VS: solución de vitrificación.

vs: *versus*

ZP: zona pelúcida.

β-HCG: subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana.

χ²: xi cuadrado.

μl: microlitro.

μm: micrómetro.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Feuer S, Rinaudo P. From Embryos to Adults : A DOHaD Perspective on In Vitro Fertilization and Other Assisted Reproductive Technologies. Healthc (Basel, Switzerland). 2016 Aug 9;4(3).
2. Allchin D. Journal of the History of Biology. Magner LN, editor. J Hist Biol. 36(2):415–7.
3. Tosti E, Ménézo Y. Gamete activation: Basic knowledge and clinical applications. Hum Reprod Update. 2016;22(4):420–39.
4. Pandya MR, Chelur V. The techniques of IVF made easy. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd.; 2015. 298 p.
5. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. Vol. 116, Archives of Pathology and Laboratory Medicine. 1992. p. 321.
6. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet. 1992 Jul;340(8810):17–8.
7. Gardner DK. In vitro fertilization: The first three decades. Gardner DK, editor. In vitro fertilization: a practical approach. Informa Healthcare USA, Inc.; 2009.
8. Kamel RM. Assisted reproductive technology after the birth of Louise Brown. Vol. 14, Journal of Reproduction and Infertility. 2013. p. 96–109.
9. Ory SJ, Devroey P, Banker M, Brinsden P, Buster J, Fiadjoe M, et al. International Federation of Fertility Societies Surveillance 2013: Preface and conclusions. Fertil Steril. 2014 Jun;101(6):1582–3.
10. Juan Carlos I. LEY 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida. BOE num 126. 2006;19947–56.
11. Cuadros J, Figueroa MJ, Herrer R, Moreno JM, Ortiz Á, Prados F, et al. Criterios ASEBIR De Valoración Morfológica De Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos. 2ª edición. Vol. 2, Cuaderno de embriología clínica. 2008. 66 p.
12. Cuadros J, Hurtado de Mendoza y Acosta MV. Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos. 3ª edición. Cuadernos de

BIBLIOGRAFÍA

- embriología clínica. ASEBIR; 2015. 98 p.
13. de Paepe C, Krivega M, Cauffman G, Geens M, van de Velde H. Totipotency and lineage segregation in the human embryo. Vol. 20, *Molecular Human Reproduction*. 2014. p. 599–618.
 14. Pauerstein CJ, Eddy CA. The role of the oviduct in reproduction; our knowledge and our ignorance. *J Reprod Fertil*. 1979;55(1):223–9.
 15. Diaz S, Ortiz ME, Croxatto HB. Studies on the duration of ovum transport by the human oviduct. III. Time interval between the luteinizing hormone peak and recovery of ova by transcervical flushing of the uterus in normal women. Vol. 137, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1980. p. 116–21.
 16. Croxatto HB, Ortiz MES. Egg transport in the fallopian tube. *Gynecol Obstet Invest*. 1975;6(3–4):215–25.
 17. Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. Vol. 332, *Nature*. 1988. p. 459–61.
 18. Hentemann M, Bertheussen K. New media for culture to blastocyst. *Fertil Steril*. 2009;91(3):878–83.
 19. Wale PL, Gardner DK. The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. *Hum Reprod Update*. 2016;22(1):2–22.
 20. Biggers JD, Bell JE, Benos DJ. Mammalian blastocyst: transport functions in a developing epithelium. *Am J Physiol*. 1988 Oct;255(4 Pt 1):C419–32.
 21. Edwards LJ, Williams DA, Gardner DK. Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: Amino acids act as buffers of intracellular pH. *Hum Reprod*. 1998;13(12):3441–8.
 22. Gardner DK, Balaban B. Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of time-lapse, algorithms and “OMICS”: Is looking good still important? Running title: Is morphology important for embryo selection? *Univ van Amsterdam Sept*. 2016;13(10):704–18.
 23. Hardarson T, Van Landuyt L, Jones G. The blastocyst. *Hum Reprod*. 2012;27(suppl 1):i72–

BIBLIOGRAFÍA

- 91.
24. Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST, Shapiro BS. Quantitative grading of a human blastocyst: Optimal inner cell mass size and shape. *Fertil Steril*. 2001;76(6):1157–67.
 25. Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: Facts and artifacts. *Hum Reprod Update*. 1995;1(2):91–148.
 26. Huisman GJ, Alberda AT, Leerentveld RA, Verhoeff A, Zeilmaker GH. A comparison of in vitro fertilization results after embryo transfer after 2, 3, and 4 days of embryo culture. *Fertil Steril*. 1994 May;61(5):970–1.
 27. Olivennes F, Hazout A, Lelaidier C, Freitas S, Fanchin R, de Ziegler D, et al. Four indications for embryo transfer at the blastocyst stage. *Hum Reprod*. 1994;9(12):2367–73.
 28. Scholtes MC, Zeilmaker GH. A prospective, randomized study of embryo transfer results after 3 or 5 days of embryo culture in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1996 Jun;65(6):1245–8.
 29. Buster JE, Bustillo M, Rodi IA, Cohen SW, Hamilton M, Simon JA, et al. Biologic and morphologic development of donated human ova recovered by nonsurgical uterine lavage. *Am J Obstet Gynecol*. 1985 Sep;153(2):211–7.
 30. Sasikala N, Rajapriya A, Mahalakshmi S, Janani DM, Archana B, Parameaswari PJ. Blastocyst culture depends on quality of embryos on day 3, not quantity. *Middle East Fertil Soc J*. 2015;20(4):224–30.
 31. Gardner DK, Schoolcraft WB. Human embryo viability: What determines developmental potential, and can it be assessed? *J Assist Reprod Genet*. 1998;15(8):455.
 32. Sills ES, Palermo GD. Human blastocyst culture in IVF: Current laboratory applications in reproductive medicine practice. *Rom J Morphol Embryol*. 2010;51(3):441–5.
 33. Chida S. Monozygous double inner cell masses in mouse blastocysts following fertilization in vitro and in vivo. *J Vitro Fertil Embryo Transf*. 1990 Jun;7(3):177–9.
 34. Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van De Meerssche M V., Ryckaert G, et al. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod*. 1999;14(9):2345–9.
 35. Gardner DK, Meseguer M, Rubio C, Treff NR. Diagnosis of human preimplantation

BIBLIOGRAFÍA

- embryo viability. *Hum Reprod Update*. 2015;21(6):727–47.
36. De Sutter P, Delbaere I, Gerris J, Verstraelen H, Goetgeluk S, Van der Elst J, et al. Birthweight of singletons after assisted reproduction is higher after single- than after double-embryo transfer. *Hum Reprod*. 2006;21(10):2633–7.
 37. Kjellberg AT, Carlsson P, Bergh C. Randomized single versus double embryo transfer: Obstetric and paediatric outcome and a cost-effectiveness analysis. *Hum Reprod*. 2006;21(1):210–6.
 38. Gruber I, Klein M. Embryo culture media for human IVF: which possibilities exist? *J Turkish Ger Gynecol Assoc*. 2011;12(2):110–7.
 39. Bolton VN, Wren ME, Parsons JH. Pregnancies after in vitro fertilization and transfer of human blastocysts. *Fertil Steril*. 1991 Apr;55(4):830–2.
 40. Swain J. Optimal Human Embryo Culture. *Semin Reprod Med*. 2015;33(2):103–17.
 41. Hambiliki F, Sandell P, Yaldir F, Stavreus-Evers A. A prospective randomized sibling-oocyte study of two media systems for culturing cleavage-stage embryos-impact on fertilization rate. *J Assist Reprod Genet*. 2011;28(4):335–41.
 42. 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(1):84–8.
 43. Gardner DK, Lane M, Calderon I, Leeton J. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril*. 1996 Feb;65(2):349–53.
 44. Fujitani Y, Kasai K, Ohtani S, Nishimura K, Yamada M, Utsumi K. Effect of oxygen concentration and free radicals on in vitro development of in vitro-produced bovine embryos. *JAnimSci*. 1997;75:483–9.
 45. Waldenström U, Engström AB, Hellberg D, Nilsson S. Low-oxygen compared with high-oxygen atmosphere in blastocyst culture, a prospective randomized study. *Fertil Steril*. 2009;91(6):2461–5.
 46. Meintjes M, Chantilis SJ, Douglas JD, Rodriguez AJ, Guerami AR, Bookout DM, et al. A controlled randomized trial evaluating the effect of lowered incubator oxygen tension on

BIBLIOGRAFÍA

- live births in a predominantly blastocyst transfer program. *Hum Reprod.* 2009 Feb;24(2):300–7.
47. Edwards RG, Fishel SB, Cohen J, Fehilly CB, Purdy JM, Slater JM, et al. Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J Vitro Fertil Embryo Transf.* 1984 Mar;1(1):3–23.
 48. Cummins JM, Breen TM, Harrison KL, Shaw JM, Wilson LM, Hennessey JF. A formula for scoring human embryo growth rates in in vitro fertilization: Its value in predicting pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality. *J Vitro Fertil Embryo Transf.* 1986 Oct;3(5):284–95.
 49. Milewski R, Kuć P, Kuczyńska A, Stankiewicz B, Łukaszuk K, Kuczyński W. A predictive model for blastocyst formation based on morphokinetic parameters in time-lapse monitoring of embryo development. *J Assist Reprod Genet.* 2015;32(4):571–9.
 50. Gardner D, Schoolcraft W. In-vitro culture of human blastocysts. Towards reproductive certainty: fertility and genetics. Parthenon Press; 1999. 378-388 p.
 51. Bos-Mikich A, Michels MS, Dutra CG, Oliveira NP, Ferreira MO, Aquino DC, et al. The impact of age on blastocyst scoring after single and double embryo transfers. *J Bras Reprod Assist.* 2016;20(1):27–32.
 52. Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 1999 Jun;11(3):307–11.
 53. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: Towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril.* 2000 Jun;73(6):1155–8.
 54. Gardner RL, Johnson MH. An investigation of inner cell mass and trophoblast tissues following their isolation from the mouse blastocyst. *J Embryol Exp Morphol.* 1972 Oct;28(2):279–312.
 55. Ansell JD, Snow MH. The development of trophoblast in vitro from blastocysts containing varying amounts of inner cell mass. *J Embryol Exp Morphol.* 1975 Feb;33(1):177–85.
 56. 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 Jun 1;26(6):1270–83.

BIBLIOGRAFÍA

57. Glujovsky D, Blake D, Bardach A, Farquhar C, Glujovsky D, Blake D, et al. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology (Review) Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. 2013;(6).
58. Gardner DK, Lane M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? Hum Reprod Update. 1997;3(4):367–82.
59. Karacan M, Ulug M, Arvas A, Cebi Z, Berberoglugil M, Batukan M, et al. Comparison of the transfer of equal numbers of blastocysts versus cleavage-stage embryos after repeated failure of in vitro fertilization cycles. J Assist Reprod Genet. 2014;31(3):269–74.
60. Janny L, Menezo YJR. Maternal age effect on early human embryonic development and blastocyst formation. Mol Reprod Dev. 1996 Sep;45(1):31–7.
61. Kdous M, Merdassi G, Braham M, Zhioua A, Zhioua F. Impact of gamete cell quality on the outcome of intracytoplasmic sperm injection. Tunis Med. 2015 Dec;93(12):750–5.
62. van Loendersloot LL, van Wely M, Limpens J, Bossuyt PMM, Repping S, van der Veen F. Predictive factors in in vitro fertilization (IVF): A systematic review and meta-analysis. Hum Reprod Update. 2010;16(6):577–89.
63. Rates TS. Aging and infertility in women: A committee opinion. Vol. 78, Fertility and Sterility. 2002. p. 215–9.
64. Zhang Z, Zhu LL, Jiang HS, Chen H, Chen Y, Dai YT. Predictors of pregnancy outcome for infertile couples attending IVF and ICSI programmes. Andrologia. 2016 Nov;48(9):874–81.
65. Hull MG, Fleming CF, Hughes AO, McDermott A. The age-related decline in female fecundity: a quantitative controlled study of implanting capacity and survival of individual embryos after in vitro fertilization. Fertil Steril. 1996 Apr;65(4):783–90.
66. Munné S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. Fertil Steril. 1995 Aug;64(2):382–91.
67. Hammadeh ME, Al-Hasani S, Stieber M, Rosenbaum P, Kúpker D, Diedrich K, et al. The effect of chromatin condensation (aniline blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an

BIBLIOGRAFÍA

- intracytoplasmic sperm injection programme. *Hum Reprod.* 1996 Nov;11(11):2468–71.
68. Oehninger S. Intracytoplasmic sperm injection: results from Norfolk, USA. *Hum Reprod.* 1996 Sep;11 Suppl 1:73-5-5.
69. Janny L, Menezo YJR. Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation. *Mol Reprod Dev.* 1994;38(1):36–42.
70. Shoukir Y, Chardonens D, Campana A, Sakkas D. Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: A paternal influence? *Hum Reprod.* 1998 Jun;13(6):1632–7.
71. Sanchez R, Stalf T, Khanaga O, Turley H, Gips H, Schill WB. Sperm selection methods for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in andrological patients. *J Assist Reprod Genet.* 1996 Mar;13(3):228–33.
72. Avendaño C, Franchi AI, Duran H, Oehninger S. DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril.* 2010;94:549–57.
73. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. Vol. 9, *Human Reproduction Update.* 2003. p. 331–45.
74. Simon L, Brunborg G, Stevenson M, Lutton D, McManus J, Lewis SEM. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. *Hum Reprod.* 2010;25(7):1594–608.
75. Ni W, Xiao S, Qiu X, Jin J, Pan C, Li Y, et al. Effect of Sperm DNA Fragmentation on Clinical Outcome of Frozen-Thawed Embryo Transfer and on Blastocyst Formation. 2014;
76. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod.* 1999 Apr;14(4):1039–49.
77. Lewis SEM, Agbaje I, Alvarez J. Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis. *Syst Biol Reprod Med.* 2008;54(3):111–25.
78. Speyer BE, Pizzey AR, Ranieri M, Joshi R, Delhanty JDA, Serhal P. Fall in implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation. *Hum Reprod.* 2010;25(7):1609–18.

BIBLIOGRAFÍA

79. Steger K, Cavalcanti MCO, Schuppe HC. Prognostic markers for competent human spermatozoa: Fertilizing capacity and contribution to the embryo. *Int J Androl.* 2011;34(6 PART 1):513–27.
80. Aktan G, Dođru-Abbasođlu S, Kűkűkgergin C, Kadiođlu A, 23demirler-Erata G, Koçak-Toker N. Mystery of idiopathic male infertility: Is oxidative stress an actual risk? *Fertil Steril.* 2013;99(5):1211–5.
81. Bungum M, Bungum L, Giwercman A. Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility. *Asian J Androl.* 2011;13(1):69–75.
82. Wdowiak A, Bakalczuk S, Bakalczuk G. The effect of sperm DNA fragmentation on the dynamics of the embryonic development in intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Biol.* 2015;15(2):94–100.
83. Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *J Androl.* 2009;30(3):219–29.
84. Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1998 Jul;13(7):1864–71.
85. Payne JF, Raburn DJ, Couchman GM, Price TM, Jamison MG, Walmer DK. Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques. *Fertil Steril.* 2005;84(2):356–64.
86. El-Mouatassim S, Bilotto S, Russo GL, Tosti E, Menezo Y. APEX/Ref-1 (apurinic/apyrimidic endonuclease DNA-repair gene) expression in human and ascidian (*Ciona intestinalis*) gametes and embryos. *Mol Hum Reprod.* 2007;13(8):549–56.
87. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BCJM, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L. ESHRE consensus on the definition of 'poor response to ovarian stimulation for in vitro fertilization: The Bologna criteria. *Hum Reprod.* 2011;26(7):1616–24.
88. Edition F. Examination and processing of human semen. Vol. Edition, V, World Health. World Health Organization; 2010. 286 p.
89. Waldenstr23m U, Engstr23m AB, Hellberg D, Nilsson S. Low-oxygen compared with high-oxygen atmosphere in blastocyst culture, a prospective randomized study. *Fertil Steril.*

BIBLIOGRAFÍA

- 2009 Jun;91(6):2461–5.
90. Scott LA, Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod.* 1998;13(4):1003–13.
 91. Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online.* 2005 Nov;11(5):608–14.
 92. Liebermann J, Tucker MJ, Sills ES. Cryoloop vitrification in assisted reproduction: Analysis of survival rates in >1000 human oocytes after ultra-rapid cooling with polymer augmented cryoprotectants. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2003;30(2–3):125–9.
 93. Cerda J, Cifuentes L. Using ROC curves in clinical investigation: theoretical and practical issues. *Rev Chil infectología.* 2012 Apr;29(2):138–41.
 94. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K E Al. Glosario de terminología en Técnicas de Reproducción Asistida (TRA). Versión revisada y preparada por el International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) y la Organización Mundial de la Salud (OMS). 2010. p. 1–11.
 95. Yavetz H, Gamzu R, Botchan A, Amit A, Lessing JB, Paz G, et al. Female age does not affect the capacity of human zona pellucida to bind spermatozoa. *Hum Reprod.* 1995 Sep;10(9):2368–70.
 96. Meldrum DR, Casper RF, Diez-Juan A, Simon C, Domar AD, Frydman R. Aging and the environment affect gamete and embryo potential: Can we intervene? *Fertil Steril.* 2016;105(3):548–59.
 97. Navot D, Drews MR, Bergh PA, Guzman I, Karstaedt A, Scott RT, et al. Age-related decline in female fertility is not due to diminished capacity of the uterus to sustain embryo implantation. *Fertil Steril.* 1994 Jan;61(1):97–101.
 98. Olszanska B, Borgul A. Maternal RNA content in oocytes of several mammalian and avian species. *J Exp Zool.* 1993 Mar 1;265(3):317–20.
 99. Van Blerkom J. Mitochondria as regulatory forces in oocytes, preimplantation embryos and stem cells. *Reprod Biomed Online.* 2008;16(4):553–69.
 100. Vemd V, Vemd V, Hartog D. Are clinical and biological FVF parameters correlated with

BIBLIOGRAFÍA

- chromosomal disorders in early life: a multicentric study. *Hum Reprod.* 1998;21(5):918–22.
101. Jamieson ME, Coutts JRT, Connor JM. The chromosome constitution of human preimplantation embryos fertilized in vitro. *Hum Reprod.* 1994 Apr;9(4):709–15.
 102. Kornafel KL, Sauer M V. Increased rates of aneuploidy in older women. Increased rates of aneuploidy do not occur in gestations of older embryo recipients. *Hum Reprod.* 1994 Nov;9(11):1981–2.
 103. García-Ferreyra J, Luna D, Villegas L, Romero R, Zavala P, Hilario R, et al. High Aneuploidy Rates Observed in Embryos Derived from Donated Oocytes are Related to Male Aging and High Percentages of Sperm DNA Fragmentation. *Clin Med insights Reprod Heal.* 2015;9–21.
 104. Abdalla HI, Burton G, Kirkland A, Johnson MR, Leonard T, Brooks AA, et al. Age, pregnancy and miscarriage: uterine versus ovarian factors. *Hum Reprod.* 1993 Sep;8(9):1512–7.
 105. Krawetz SA. Paternal contribution: new insights and future challenges. *Nat Rev Genet.* 2005 Aug;6(8):633–42.
 106. Sutovsky P, Schatten G. Paternal contributions to the mammalian zygote: fertilization after sperm-egg fusion. *Int Rev Cytol.* 2000;195(X):1–65.
 107. Parinaud J, Mieusset R, Vieitez G, Labal B, Richoilley G. Influence of sperm parameters on embryo quality. *Fertil Steril.* 1993 Nov;60(5):888–92.
 108. Nagy ZP, Liu J, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, et al. The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod.* 1995 May;10(5):1123–9.
 109. Tripp B., Lewitton M, Hoekstra T, Gvakharia M, Carson S., Buster J., et al. P-044 Intracytoplasmic sperm injection results as evaluated by multiple outcome assessment is not influenced by male factors. *Fertil Steril.* 1997 Jan;68:S113–4.
 110. Mercan R, Lanzendorf SE, Mayer Jr. J, Nassar A, Muasher SJ, Oehninger S. The outcome of clinical pregnancies following intracytoplasmic sperm injection is not affected by semen quality. *Andrologia.* 1998;30(2):91–5.
 111. Mansour RT, Aboulghar MA, Serour GI, Amin YM, Ramzi AM. The effect of sperm

BIBLIOGRAFÍA

- parameters on the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 1995 Nov;64(5):982–6.
112. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1988 Jan;49(March):112–7.
113. Sukcharoen N, Sithipravej T, Promviengchai S, Chinpilas V, Boonkasemsanti W. Sperm morphology evaluated by computer (IVOS) cannot predict the fertilization rate in vitro after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 1998 Mar;69(3):564–8.
114. Lundin K, Söderlund B, Hamberger L. The relationship between sperm morphology and rates of fertilization, pregnancy and spontaneous abortion in an in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection programme. *Hum Reprod*. 1997 Dec;12(12):2676–81.
115. Svalander P, Jakobsson AH, Forsberg AS, Bengtsson AC, Wikland M. The outcome of intracytoplasmic sperm injection is unrelated to “strict criteria” sperm morphology. *Hum Reprod*. 1996 May;11(5):1019–22.
116. Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod*. 2000 Aug;15(8):1717–22.
117. Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwercman A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl*. 2006;8(1):11–29.
118. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne P a, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl*. 2000;21(1):33–44.
119. Evgeni E, Lymberopoulos G, Touloupidis S, Asimakopoulos B. Sperm nuclear DNA fragmentation and its association with semen quality in Greek men. *Andrologia*. 2015;47(10):1166–74.
120. Oleszczuk K, Giwercman A, Bungum M. Sperm chromatin structure assay in prediction of in vitro fertilization outcome. *Andrology*. 2016;4(2):290–6.
121. Evgeni E, Lymberopoulos G, Gazouli M, Asimakopoulos B. Conventional semen parameters and DNA fragmentation in relation to fertility status in a Greek population.

BIBLIOGRAFÍA

- Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2015;188:17–23.
122. Ramzan MH, Ramzan M, Khan MM, Ramzan F, Wahab F, Khan MA, et al. Human semen quality and sperm DNA damage assessed by comet assay in clinical groups. *Turkish J Med Sci.* 2015;45(3):729–37.
 123. Ioannou D, Miller D, Griffin DK, Tempest HG. Impact of sperm DNA chromatin in the clinic. Vol. 33, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 2016. p. 157–66.
 124. Zheng J, Lu Y, Qu X, Wang P, Zhao L, Gao M, et al. Decreased sperm motility retarded ICSI fertilization rate in severe oligozoospermia but good-quality embryo transfer had achieved the prospective clinical outcomes. *PLoS One.* 2016;11(9).
 125. Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2004;82(2):378–83.
 126. Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1998;69(3):528–32.
 127. Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril.* 2004;81(5):1289–95.
 128. Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod.* 2004 Apr 22;19(6):1401–8.
 129. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P, Leter G, et al. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod.* 2004 Apr 22;19(6):1409–17.
 130. Check JH, Graziano V, Cohen R, Krotec J, Check ML. Effect of an Abnormal Sperm Chromatin Structural Assay (Scsa) on Pregnancy Outcome Following (Ivf) With Icsi in Previous Ivf Failures. *Arch Androl.* 2005 Jan 9;51(2):121–4.
 131. Rougier N, Uriondo H, Papier S, Checa MA, Sueldo C, Alvarez Sedó C. Changes in DNA fragmentation during sperm preparation for intracytoplasmic sperm injection over time.

BIBLIOGRAFÍA

- Fertil Steril. 2013;100(1):69–74.
132. Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET, Evenson DP. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril*. 2003 Oct;80(4):895–902.
 133. Evgeni E, Charalabopoulos K, Asimakopoulos B. Human sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters. *J Reprod Infertil*. 2014 Jan;15(1):2–14.
 134. Bradley CK, McArthur SJ, Gee AJ, Weiss KA, Schmidt U, Toogood L. Intervention improves assisted conception intracytoplasmic sperm injection outcomes for patients with high levels of sperm DNA fragmentation: a retrospective analysis. *Andrology*. 2016;4(5):903–10.
 135. Evenson D, Wixon R. Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reprod Biomed Online*. 2006 Apr;12(4):466–72.
 136. Zhang Z, Zhu L, Jiang H, Chen H, Chen Y, Dai Y. Sperm DNA fragmentation index and pregnancy outcome after IVF or ICSI: a meta-analysis. Vol. 32, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2014. p. 17–26.
 137. Marek D, Langley M, Gardner DK, Confer N, Doody KM, Doody KJ. Introduction of blastocyst culture and transfer for all patients in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril*. 1999 Dec;72(6):1035–40.
 138. Bungum M., Bungum L., Humaidan P., Yding Andersen C . Day 3 versus day 5 embryo transfer : a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online*. 2003;7(1):98–104.
 139. Jones GM, Trounson AO. Blastocyst stage transfer: pitfalls and benefits. The benefits of extended culture 9 226. *Hum Reprod*. 1999 Jun;14(0268–1161 (Print)):1405–8.
 140. Jones GM, Trounson AO, Lolatgis N, Wood C. Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril*. 1998 Dec;70(6):1022–9.
 141. 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 Dec 1;13(12):3434–40.

BIBLIOGRAFÍA

142. Racowsky C, Jackson K V, Cekleniak NA, Fox JH, Hornstein MD, Ginsburg ES. The number of eight-cell embryos is a key determinant for selecting day 3 or day 5 transfer. *Fertil Steril* [Internet]. 2000 Mar [cited 2017 Mar 30];73(3):558–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10689013>
143. Karaki RZ, Samarraie SS, Younis NA, Lahloub TM, Ibrahim MH. Blastocyst culture and transfer: A step toward improved in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*. 2002 Jan;77(1):114–8.
144. Abdelmassih V, Balmaceda JP, Nagy ZP, Abdelmassih S, Abdelmassih R. ICSI and day 5 embryo transfers: higher implantation rates and lower rate of multiple pregnancy with prolonged culture. *Reprod Biomed Online*. 2001;3(3):216–20.
145. Bungum M, Bungum L, Humaidan P, Yding Andersen C. Day 3 versus day 5 embryo transfer: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online*. 2003;7(1):98–104.
146. Wu K, Zhao H, Liu H, Li M, Ma S, Li C, et al. Day 3 ET, single blastocyst transfer (SBT) or frozen-thawed embryo transfer (FET): Which is preferable for high responder patients in IVF/ICSI cycles? *J Assist Reprod Genet*. 2014;31(3):275–8.
147. Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update*. 1995;1:91–148.

ANEXOS

Esta tesis ha dado lugar a la presentación de dos poster en el congreso de ASEBIR 2017:



TEST DE FRAGMENTACIÓN COMO PRUEBA DE RUTINA

T. SÁNCHEZ ARENAS; M. De la Casa Heras; J. Gijón De la Santa; C. Pérez Ortiz; C. Urda Muñoz; O. López Benítez; M. Alcázar Pérez; MC. Cañadas Gálvez; J. Rodríguez ; R. Bonche; V. BADAJOZ LIÉBANA
Ginefiv, Madrid

Introducción

La fragmentación del ADN es la anomalía más común del ADN en los gametos masculinos y su análisis se considera un indicador de calidad seminal. Los espermatozoides con el ADN fragmentado pueden estar vivos, ser morfológicamente normales y capaces de fecundar un ovocito. Las muestras seminales con la fragmentación alterada no son detectables en los seminogramas rutinarios y, la posibilidad de elegir un espermatozoide con el ADN dañado para realizar la ICSI debe tenerse en cuenta.

Objetivos

Se quiso conocer si hubo alguna calidad seminal más susceptible a tener el índice de fragmentación espermática (IFE) alterado.

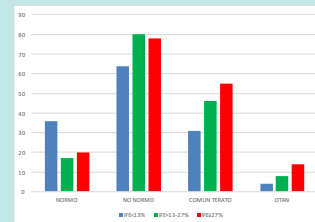
Material y Métodos

Se seleccionaron pacientes con IFE realizado en GINEFIV entre Enero del 2012 y Septiembre del 2015. El IFE se realizó por citometría de flujo. Se expresa como índice de fragmentación del DNA (IFE) y es una medida precisa y repetible. Se consideró una muestra alterada cuando el IFE fue igual o superior al 27%. Se dividió la fragmentación en tres categorías para poder estudiar más detalladamente cómo se distribuía según los grupos de calidad seminal.

Resultados

En los pacientes normozoospermicos fue más común un IFE <13%, en los no normozoospermicos, lo más común fue un IFE entre 13-27% aunque muy similar al IFE ≥ 27% y por último, tanto los que tuvieron la morfología alterada como los OTAN, lo más usual fue que un IFE alterado. A la vista de estos resultados, se pudo esperar que en pacientes con todos los parámetros seminales normales, la fragmentación también lo fuera y, en pacientes con todos los parámetros alterados (OTAN) o aquellos con morfología anormal, la fragmentación también lo estuviera. No obstante, existen pacientes con un IFE alterado y parámetros seminales normales y pacientes con un IFE normal y parámetros seminales alterados.

TRES CATEGORIAS	IFE	N	MEDIA ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR	P-VALOR		
				1º2	1º3	2º3
NORMO	<13%	64	0,36 ± 0,48	0,02	0,01	0,70
	13-27%	63	0,17 ± 0,38			
	≥27%	39	0,20 ± 0,40			
NO NORMOS	<13%	64	0,64 ± 0,48	0,03	0,17	0,63
	13-27%	63	0,80 ± 0,40			
	≥27%	39	0,78 ± 0,41			
COMUN TERATO	<13%	64	0,31 ± 0,47	0,04	0,02	0,67
	13-27%	63	0,46 ± 0,50			
	≥27%	39	0,55 ± 0,50			
OTAN	<13%	64	0,04 ± 0,21	0,34	0,14	0,69
	13-27%	63	0,08 ± 0,27			
	≥27%	39	0,14 ± 0,35			



Conclusiones

El seminograma básico fue una herramienta de diagnóstico con un valor predictivo limitado, ya que la información aportada no analizó la integridad del genoma masculino. El IFE fue una medida que en algunos casos es independiente de la calidad seminal y puede proporcionarnos información diagnóstica y pronóstico complementaria, pero distinta, de la obtenida de un seminograma. A pesar de tener en cuenta tales premisas, los datos analizados en nuestro estudio no permiten recomendar el IFE como una prueba de rutina en todos los pacientes. Parece que los métodos de capacitación y la técnica ICSI, mejoran el IFE. Únicamente en pacientes normozoospermicos con ciclos de ICSI fallidos, podríamos encontrar en el IFE el problema reproductivo de dichos pacientes y proponerles medidas correctivas.



QUÉ TIPO DE PACIENTES SE VEN BENEFICIADOS DEL CULTIVO LARGO

T. SÁNCHEZ ARENAS; M. De la Casa Heras; J. Gijón De la Santa; C. Pérez Ortiz; C. Urda Muñoz; O. López Benítez; M. Alcáraz Pérez; MC. Cañadas Gálvez; J. Rodríguez ; R. Bonche; V. BADAJOZ LIÉBANA
Ginefiv, Madrid

Introducción

El cultivo de blastocistos es parte de la selección natural que sufren los embriones durante su desarrollo. Los blastocistos tienen mayores probabilidades de implantación y embarazo. La morfología embrionaria es el principal método de selección embrionaria para transferir/criopreservar. No existe un consenso claro para decidir transferir en día +3 o +5, aunque hay una tendencia lógica a transferir en día +5 cuando hay un mayor número de embriones en día +3.

Objetivos

Se realizó estudio retrospectivo no randomizado donde se utilizaron ciclos de ICSI con cultivo largo para valorar qué tipo de pacientes se vieron beneficiados del cultivo largo.

Material y Métodos

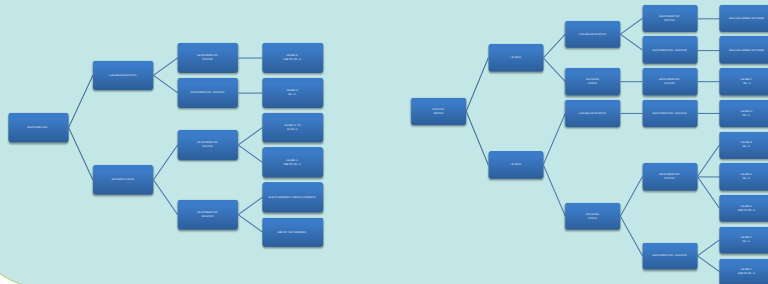
Ciclos de cultivo largo realizados en GINEFIV entre Enero del 2012 y Septiembre del 2015: 662 pacientes que generaron 2898 embriones. Se incluyeron ciclos con ovocitos propios y donados y ciclos con semen homólogo y heterólogo.

El análisis estadístico se realizó mediante el SPSS 23.0. La significación estadística: $p < 0,05$. Se realizaron modelos de regresión logística binaria para ver qué calidades fueron las que influyeron significativamente en la tasa de llegada a blastocisto y la tasa de gestación clínica.

Resultados

Los modelos de regresión logística se realizaron para: la llegada a blastocisto de al menos el 60% de los embriones y la consecución de la gestación clínica en función de las calidades propuestas en día +3 o +5.

En las receptoras de ovocitos y en las pacientes con ovocitos propios mayores de 35 años, las calidades embrionarias propuestas en día +5 tuvieron mayor valor predictivo que las propuestas en día +3. Sin embargo, las pacientes con ovocitos propios menores de 35 años, las calidades propuestas en +3, concretamente la calidad C, tuvo mayor valor predictivo que las calidades propuestas en día +5 en la consecución de la gestación clínica.



Conclusiones

El grupo de receptoras de ovocitos y ovocitos propios mayores de 35 años se vieron estadísticamente beneficiadas del cultivo largo porque se seleccionó el mejor/es embrión/es para transferir.

Las pacientes con ovocitos propios menores de 35 años, no se vieron estadísticamente más beneficiadas por el cultivo largo que por la transferencia en día +3.