
CARTA DE BIENVENIDA

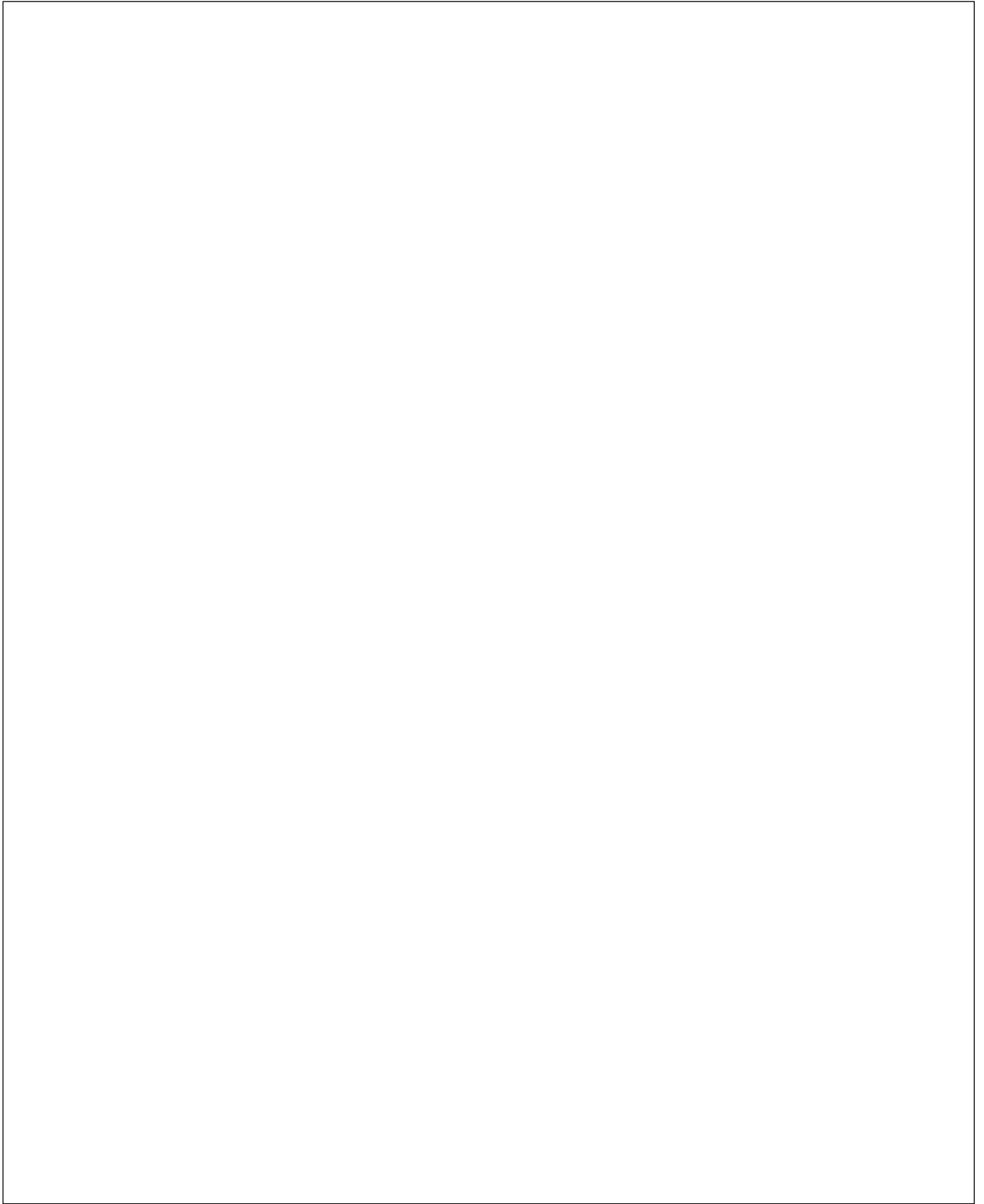
La Revista Iberoamericana de Fertilidad nos ofrece, gracias a un meritorio esfuerzo editorial, la recopilación de todas las ponencias y comunicaciones del XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad de Palma de Mallorca. Con su lectura podemos resaltar el extraordinario avance que hemos experimentado en nuestro país en esta apasionante disciplina que nos ocupa, la Medicina de la Reproducción.

Marañón, con su pluma sobria y erudita, nos relata lo que podríamos denominar la primera inseminación de la historia. El Rey Enrique IV de Castilla “El Impotente”, se casó en segundas nupcias con Juana de Portugal. Transcurridos 6 años sin conseguir descendencia, el Rey, en su desesperación, consultó con el maestro Somaya, un médico judío que practicaba inseminaciones al ganado. La Reina se sometió asiduamente a esta práctica, en la que se introducía un tubo de oro por la vagina y a través de este se depositaba el semen. Lo que no nos aclara la historia es la procedencia del semen, si del Rey (IAC) o de un amigo y fiel cortesano Don Beltrán de la Cueva (IAD). Lo cierto es que la Reina tuvo 2 embarazos, uno resultó en el nacimiento de la Infanta Juana y el otro en aborto. Años después la Reina, animada por su propio esposo, tuvo un amante del cual nacieron dos hijos más. Todas estas circunstancias fueron habilmente aprovechadas por los enemigos de la corte para dudar de la paternidad de la Infanta Doña Juana a la que apodaron “La Beltraneja”.

Desde la edad media hasta la década de los 70, el tratamiento de la esterilidad ha permanecido sin apenas cambios. Por el contrario, en los últimos 20 años La Medicina de la Reproducción ha sido la especialidad médica que más ha progresado. Según datos del Ministerio de Sanidad sólo en España, figuran registrados más de 130 centros dedicados a Técnicas de Reproducción asistida.

Quiero agradecer el esfuerzo y sacrificio de todo el equipo editorial de la RIF, que nos ha permitido contar con esta edición especial y monográfica del Congreso de la SEF de Palma de Mallorca. Esta publicación comprende 45 ponencias, 172 comunicaciones orales y 119 posters que teniendo en cuenta la procedencia de los trabajos y el reconocido prestigio de los ponentes aseguran el éxito científico de los ponentes. Estoy convencido de que todos los que nos preocupamos en aprender cada día algo más del tratamiento de la esterilidad, vamos a conservar este ejemplar en un lugar preferente de nuestra biblioteca.

Bartolomé Darder Andreu
Presidente Comité Organizador



Comité de Honor

Presidencia de Honor

Su Majestad La Reina Doña Sofía

Miembros de Honor

Muy Honorable Señor Don Francesc Antich
Presidente del Gobierno de las Islas Baleares

Excelentísima Señora Doña Celia Villalobos
Ministra de Sanidad

Honorable Señora Doña María Antonia Munar
Presidenta del Consell de Mallorca

Honorable Señora Doña Aina Salom
Consellera de Sanidad

Ilustrísimo Señor Don Juan Fageda
Alcalde de Palma de Mallorca

Comité Organizador

Presidente

B. Darder

Vicepresidente

M. Uzandizaga

Secretario

M. Rosselló

Tesorera

S. Cañellas

Vocales

R. Calafell

A. Calvo

C. Cerdán

J.A. Ferrer

A. Forteza

A. Roses

M. Torres

C. Viader

Comité Científico

Presidente

J. Marqueta

Vocales

M. Bonada

R. Buxaderas

A. De la Fuente

S. Egozcue

E. Fernández

J. Ferro

D. Guerra

L. Mercé

F. Pérez

N. Torras

J. Vendrell

Junta Directiva

Presidente

P. Viscasillas

Presidente Electo

A. Romeu

Secretario General

R. Matorras

Tesorero

B. Coroleu

Vocales

J.L. Ballescá

R. Bernabeu

C. Cuadrado

L. Martínez

A. Palumbo

Carta de bienvenida	5
Comité Organizador y Científico	7
Ponencias	
– Parámetros naturales en reproducción	13
– Estudio genético de la pareja estéril/infértil	18
– Ecografía y Reproducción	22
– Mejoras en el laboratorio de FIV	39
– Criopreservación de espermatozoides en situaciones límite	45
– Racionalización de los tratamientos de reproducción	54
– La práctica de la reproducción asistida en los hospitales públicos españoles	60
– ¿Estamos progresando en los diagnósticos clínico y fisiopatológico de los defectos de los espermatozoos	63
– Actitud ante el paciente azoospermico	71
– Factor masculino y calidad embrionaria	79
– Fertilidad después de una embolización de mioma	84
– Anticoncepción con gestágenos. Propuestas actuales	86
– Anticoncepción en edades límite	90
– Nuevas técnicas de bloqueo tubárico. Esterilización tubárica histeroscópica con el método ESSURE	93
– Hiperinsulinismo y Reproducción	98
– Leptina y reproducción, aspectos clínicos y experimentales	101
– Estudio de la reserva ovárica	104
– El papel de la Enfermera de Reproducción Asistida en Europa	108
– Seguimiento de familias de reproducción asistida: estudio europeo de la transición a la adolescencia	112

–Luces y sombras de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida	118
– Estudio molecular de la infertilidad masculina secretora en una muestra de la población española	124
–Presencia del virus de la inmunodeficiencia humana y el virus de la hepatitis C en el semen lavado: ¿ausentes o presentes pero no infectivos?	128
– El ácido docosahexaenoico corrige un defeco lipídico en células germinales y espermatozoides del epidídimo y aumenta la producción de espermatozoides en ratones cftr -/-	136
–Cambios hemodinámicos en pacientes asintomáticas en un ciclo de fecundación in vitro: Caracterización cronológica a lo largo de la fase lútea y su relación con los esteroides ováricos y citoquinas	141
– Nuevo protocolo de estimulación con FSH recombinante en pacientes anovuladoras grupo II de la OMS con ciclos cancelados por nula respuesta	146
– Análisis citoquímico ultraestructural de los componentes glucídicos contenidos en la zona pelúcida y gránulos corticales de ovocitos humanos	152
– Incremento de la expresión del inhibidor de CDKs (“Cyclin Dependent Kinase”) p27 en embriones bloqueados en estadio de células	158
– Prevención de embarazos triples transfiriendo “al menos un embrión de muy buena calidad”	163
– La transferencia ecoguiada mejora las tasas de embarazos y aumenta la frecuencia de las transferencias fáciles	166
– Inhibina y desarrollo folicular en el trasplante heterotópico de ovario sin pedículo vascular en ratas lewis singénicas	172
– Estrategia ante el fallo repetido de implantación	179
– Prevención del embarazo múltiple en reproducción asistida	184
– Congelación de ovocitos y tejido ovárico: situación actual y perspectivas futuras	185
– Diagnóstico genético preimplantacional	190
– La clonación: la actualidad y el futuro	194
Comunicaciones Orales	199
Trabajos Premiados años 2000	287
Trabajos Premiados años 2001	295
Comunicaciones en Poster	309

PONENCIAS

Parámetros naturales en reproducción

Castilla JA, García-Peña M^aL, Núñez AI, Blanco M, Fernández A.

Unidad de Reproducción. H.U. "Virgen de las Nieves". Granada

En la literatura científica son múltiples los trabajos que sugieren un efecto deletéreo del medioambiente en la capacidad reproductiva de la especie humana en los últimos años. Estos trabajos analizan los cambios que se producen en las tasas de hipospadias, embarazo ectópico, cáncer testicular, criptorquidia, gemelos dicigóticos, relación entre sexos, y calidad seminal, entre otros (James, 1997). Todas estas modificaciones, de existir, deberían compararse con el estado y capacidad reproductiva natural del hombre, no obstante es difícil determinar ésta pues va a depender en gran parte de factores socioculturales, los cuales no sólo son diferentes entre culturas, sino que dentro de éstas cambian con el tiempo. Esto hace que no sean válidas muchas conclusiones extraídas de datos epidemiológicos ya que estos se encuentran sesgados por el componente sociocultural citado anteriormente. Por ejemplo, no podemos decir que está disminuyendo la capacidad reproductiva humana basada en el número de hijos por matrimonio, ya que este índice va a depender sobretodo de factores socioculturales más que de factores biológicos.

Esto nos obliga a estudiar modelos demográficos determinados donde los factores comentados anteriormente influyan lo menos posible. Dentro de los posibles modelos destaca el de la secta protestante de los hutteritas. Esta curiosa secta, fundada en 1529 por las predicaciones de Hutter, después de muchas vicisitudes a lo largo de 300 años, emigró prácticamente en masa a los Estados Unidos en 1874 estableciéndose los 443 supervivientes en Dakota del Sur en tres colonias: Dariusleut (137), Schmiedenleut (194) y Lehreleut (112). Constituyendo unas comunidades aisladas del resto de la población y sometidas a un especial régimen de vida. En 1918 emigran parte a Canadá (Alberta, Manitoba), y a lo largo del siglo XX se extienden por otros estados de Estados

Unidos. Es obligado comentar tres peculiaridades en la doctrina hutterita que tienen interés demográfico. La primera es que el modo ideal de vida para ellos es comunal. Cuando se forma un matrimonio, el resto de la comunidad le construye la casa y le proporciona medios de vida. Los hijos habidos son igualmente alimentados y educados por la comunidad, que recoge todos los ingresos y subviene a todas las necesidades. De esta forma no hay reparo en tener un número elevado de hijos. La contracepción está prohibida por precepto. Los hijos ilegítimos son casi nulos. La segunda característica es que el matrimonio sólo es posible después del bautizo, el cual tiene lugar después de la mayoría de edad, con plena conciencia, por tanto los hutteritas no contraen matrimonio hasta después de los 17 años. La tercera característica es que todo movimiento demográfico queda recogido en el libro de la iglesia (kirchenbunch), lo que permite un registro casi perfecto. Todas estas características hacen de los hutteritas un verdadero experimento demográfico que nos permite establecer parámetros de reproducción natural.

Rendimiento reproductivo

Si queremos averiguar cuál es el número de hijos que puede tener una pareja humana en un medio favorable, podemos realizar un cálculo, basándonos en los conocimientos acerca de la duración de la vida reproductiva de la mujer, la frecuencia de la ovulación y la duración del embarazo y lactancia. Tal cálculo arroja una cifra relativamente alta, y fácilmente se llega al cálculo de 20-25 hijos. Sin embargo dicho cálculo es una especulación, no un hecho observado (Salvatierra, 1968).

Analicemos los datos existentes en la literatura sobre el rendimiento reproductivo de los hutteritas. De

las 3 colonias con 443 habitantes comentadas (221 varones y 222 mujeres) en el censo de 1880, pasaron a formar 93 colonias con 8.542 habitantes en 1950. En la década 1940-50 la población norteamericana aumentó en un 14,5%, los hutteritas en un 52,1%. Se calcula que actualmente los hutteritas se duplican cada 16 años. Guttmacher (1956) estudió el rendimiento reproductor de 340 mujeres hutteritas no seleccionadas mayores de 45 años en 1950. Incluyendo estériles y viudas, el término medio de hijos era de 8,9 por matrimonio. La moda era algo más alta (10,4). La cifra máxima de hijos en el grupo fue de 16. Puede calcularse que si las hutteritas se casaran antes de los 17 años, tendrían 2,5 hijos más, elevando la moda a 13. Teniendo en cuenta que en el 12% de los embarazos hubo aborto, la conclusión es que en una población en condiciones excelentes de vida, sin presiones externas y sin prácticas limitadoras, el número de embarazos típico es de 14,5 por matrimonio. Este resultado coincide con otros estudios demográficos similares en mujeres a primeros de siglo cuando la contracepción no se había extendido (Salvatierra, 1968), y como vemos esta alejada de la teórica sugerida anteriormente.

Como muestra del modelo único que son los hutteritas en estudios reproductivos, comentemos que el número de hijos por matrimonio en los huteritas ha disminuido a partir de los años 60, debiéndose a una disminución en la capacidad reproductiva en mujeres de 30-40 años, es decir, el número de hijos por matrimonio es el mismo a principio de siglo que a partir de los 60 en las mujeres hutteritas que tienen entre 20-30 años, pero es menor a partir de los años 60 que a principio de siglo si comparamos matrimonios cuyas mujeres tienen 30-40 años. Esto ha sugerido que cierto control de la natalidad se ha introducido en los hutteritas a partir de los años 60 (Sato et al., 1994; Nonaka et al., 1994).

En cuanto a la incidencia de esterilidad primaria (parejas sin embarazo al año de casarse) antes de los años 60 se estima en los hutteritas que es de un 12%. Existiendo un 3% de parejas sin hijos. La esterilidad secundaria (sin segundo hijo a los 3 años del primero) se estima en hutteritas que alcanza el 5,4%. Existiendo un 1.8% de parejas con un solo hijo a los 10 años de casarse, siendo en la mayoría de estas parejas la mujer mayor de 35 años. Podemos por tanto afirmar que la esterilidad tanto primaria como secundaria tiende a resolverse con el tiempo en un elevado porcentaje de casos.

Eficiencia reproductiva

El término eficiencia implica analizar los resultados obtenidos en referencia al gasto o esfuerzo reali-

zado. En reproducción sería el número de coitos necesarios para obtener un embarazo. En estudios en hutteritas se pudo comprobar por Eaton y Mayer (1963) que el término medio de coitos necesario para obtener una gestación en mujeres de 20-29 años es de 108 coitos. Otros estudios en diferentes poblaciones obtienen cifras similares, remarcando la importancia de la edad de la mujer, así como la frecuencia del coito, y no solo el número (Salvatierra, 1968).

Gemelos dicigóticos

Es conocido desde hace tiempo que la tasa de partos gemelares dicigóticos es más alta en mujeres añosas que en jóvenes, por lo que cabría esperar una mayor tasa en mujeres hutteritas que en la población general, ya que estas tienen un vida reproductiva más larga. Sin embargo, la tasa de nacimientos de gemelos dicigotos en hutteritas de Canada es del 0.9% frente al 1,2% de la población general canadiense. El comentado descenso del número de hijos medio por familia a partir de los años 60, en especial en mujeres mayores de 35 años tiene su reflejo en que el porcentaje de partos gemelares, esté disminuyendo desde esa década en los hutteritas (Nonaka et al., 1993).

Con los registros de nacimientos desde 1900 hasta 1965 se demuestra que los meses que menos partos gemelares hay entre los hutteritas es en los meses de mayo-julio que corresponden a menos poliovuclaciones en los meses de agosto-octubre. Lo que sugiere una asociación entre factores ambientales (horas de sol, temperatura) y regulación de la ovulación. Al analizar estos datos a partir de 1965 se comprueba la ya comentada reducción en la tasa de embarazos gemelares, y se observa que se pierde el descenso en la tasa de partos de gemelos dicigóticos descrita previamente en los meses de mayo-julio. Esto puede deberse a factores ambientales como cambios en la temperatura ambiente por la aparición de la calefacción o a cambios higiénicos (Nonaka et al., 1993)

Consanguinidad y reproducción

Como hemos comentado el origen definido y la endogamia son dos características de los hutteritas, que los convierten en un modelo ideal de estudios genético poblacionales. A pesar de lo que cabría pensar, la tasa de anomalías congénitas es similar en los hutteritas que en la población de su entorno (5,1% en hutteritas de Alberta versus 5% en población general de Alberta) (Hostetler, 1984). Esto se debe a que si bien presentan más frecuencia de enfermedades monogénicas: aciduria metilmalónica, hipofosfatasa, S. Meckel, leucodistrofia, etc. (4% versus 3%), debido a

la posibilidad de homocigosis en enfermedades autosómicas recesivas, la frecuencia de anomalías congénitas multifactoriales es menor (1,1 versus 2%) (Deformidades de extremidades, hidrocefalia, anencefalia, defecto cardíaco). Esto último puede ser debido a que en estas enfermedades de origen genético y ambiental el modo de vida de los hutteritas favorece la prevención de dichas anomalías.

Al ser una comunidad cerrada sin incorporaciones exteriores, el grado de endogamia va aumentando. Ober et al. (1999) han estudiado la relación entre capacidad reproductiva y grado de consanguinidad de las mujeres. Comprobando que las mujeres cuyos padres tenían un alto grado de consanguinidad tenían una media menor de hijos, tardaban más en quedarse embarazadas y tenían un intervalo mayor entre embarazos que las mujeres que tenían padres con un bajo grado de parentesco. Sin embargo, la tasa de abortos no se vio influida por el grado de consanguinidad. Estos hallazgos nos permiten concluir que deben existir alelos recesivos que influyen negativamente en la capacidad reproductiva.

Entre los genes candidatos podría ser que predominasen unos determinados haplotipos HLA en la población hutterita que influyera en su capacidad reproductiva. No obstante, Weitkamp y Ober (1999) demostraron que la frecuencia y variedad de genes del sistema mayor de histocompatibilidad en los hutteritas no difiere del de poblaciones no endogámicas, es decir que los hallazgos comentados no se deben a la presencia de un haplotipo HLA infrecuente o raro en la población hutterita.

Antígenos HLA entre miembros de una pareja

Son clásicos los estudios en hutteritas que sugieren que aquellas parejas que comparten algún antígeno HLA presentan un periodo más largo para quedar embarazadas y la tasa de abortos es mayor que los que no comparten ningún antígeno HLA (Ober et al., 1985). Ninguna hutterita estudiada tubo dos abortos consecutivos, ni predominó ningún haplotipo en estas parejas con algún aborto. Aunque estos datos no son extrapolables a la población general (Castilla y col., 1999) sugieren que es necesario un reconocimiento inmunológico por parte de la madre del feto y sus envolturas como extraño (inmunológicamente hablando).

Si se estudian los haplotipos de recién nacidos de parejas que comparten algún antígeno HLA, y la hipótesis anterior es cierta deberían predominar en los hijos haplotipos que fueran lo más antigénicamente diferentes de los de la madre. Ober et al (1998) estudiaron los haplotipos de parejas que compartían algún antígeno HLA, y clasificaron a los hijos en incompa-

tible (alelo paterno heredado no coincide con ningún alelo de la madre), compatible-homocigoto (alelo paterno heredado coincide con el alelo materno heredado), compatible-heterocigoto (alelo paterno heredado coincide con el alelo materno no heredado). Estos autores calcularon el porcentaje teórico de cada tipo, y encontraron un menor porcentaje de hijos compatibles-heterocigotos. Es decir que existía una tendencia a abortar fetos que fueran idénticos a la madre. Los fetos compatible-homocigotos y compatibles-heterocigotos son equivalentes desde la perspectiva de la madre, pues no presentan ningún antígeno diferente a los suyos, pero desde la perspectiva del feto en los compatibles-homocigotos la madre es diferente antigénicamente pues presenta un antígeno diferente no heredado por el feto. Sin embargo desde la perspectiva del feto compatible-heterocigoto la madre es antigénicamente igual. En resumen estos datos sugieren que lo importante no es que la madre reconozca como extraño al feto, sino que sea el feto el que reconozca como extraño a la madre (Ober, 1999).

Si ahora analizamos la frecuencia esperada de homocigotos HLA en la población general hutterita, no en los hijos de parejas que comparten algún antígeno HLA como en el trabajo de Ober (1999), se comprueba que existen menos homocigotos HLA de lo estimado teóricamente por la Ley de Hardy-Weinberg, sin embargo otros polimorfismos si cumplen a la perfección dicha ley (Ober et al., 1997; Robertson et al., 1999). Como ya hemos demostrado que los hijos homocigotos de parejas que comparten HLA no tienden a abortarse, debemos descartar que la menor frecuencia de homocigotos se deba a que se aborten más dichos fetos. Otra posibilidad para explicar que existan menos homocigotos HLA entre los hutteritas es que la variedad de haplotipos HLA en dicha población sea mayor que en la población general, reduciendo la posibilidad de que se reproduzcan miembros con haplotipos iguales. Ésta hipótesis se puede descartar ya que se ha comprobado que tanto la frecuencia como la variedad de haplotipos HLA en hutteritas es similar a poblaciones no imbricadas (Weitkamp and Ober, 1999). Una tercera posibilidad sugerida por algunos autores es que, al igual que en roedores, exista una tendencia natural entre hutteritas a emparejarse con personas que sean diferentes antigénicamente, es decir HLA diferentes.

Los primeros trabajos sobre apareamiento en ratones y sistema HLA, datan de mediados de los años 70, donde se comprobó que los ratones no se apareaban con ratones que tengan HLA similar al de sus padres (Yamazaki et al., 1976; Yamazaki et al., 1978). Posteriormente, se demostró que lo importante a la hora de aparearse los ratones no era el haplotipo de

los padres sino de quien lo había amamantado, es decir los ratones tendían a aparearse con ratones que tuvieran antígenos HLA diferentes de los ratones que los habían amamantado (Yamazaki et al., 1988). Dado que el olor en ratones está relacionado con los genes del sistema HLA (Ferstl et al., 1992) parece que los roedores son capaces de reconocer las diferencias HLA mediante el olfato.

Con el objeto de comprobar que los hutteritas tendían a formar una familia con hutteritas que fueran lo más diferente antigénicamente HLA, y que reconocían a estos por el olor, se ha estudiado recientemente el polimorfismo de genes de receptores olfatorios asociados a HLA en hutteritas comprobándose que no existe una diferente distribución de polimorfismo en los hutteritas que en la población general, por lo que los autores afirman que hoy día no tenemos evidencias para concluir que los hutteritas tienden a seleccionar a su pareja por el olor como ocurre en roedores (Eklund et al., 2000). No obstante, los datos obtenidos por estos autores han sido cuestionados dado que otros autores creen que el polimorfismo estudiado (FAT11) representa dos genes olfatorios diferentes en vez de dos variantes alélicas de un mismo gen (Ziegler et al., 2000)

En resumen, utilizando a los hutteritas como modelo experimental único e irrepetible de reproducción natural podemos concluir que:

- 1.- La especie humana es poco eficiente reproductivamente hablando.
- 2.- La influencia de factores ambientales naturales (horas de sol, temperatura) sobre el sistema reproductor humano tiende a desaparecer posiblemente por las condiciones de vida del mundo desarrollado.
- 3.- Parecen existir genes recesivos que intervienen en nuestra capacidad reproductiva.
- 4.- La interrelación inmune madre-feto parece depender más de lo antigénicamente diferente que sea la madre para el feto, que de lo antigénicamente diferente que sea el feto para la madre.
- 5.- Por último, no tenemos evidencias suficientes para afirmar que el sistema olfatorio intervenga en la selección de pareja en humanos, siendo necesario revisar los estudios genéticos realizados hasta ahora en hutteritas.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Castilla JA, Suárez I, Expósito A, Clavero A, Álvarez C, Ruiz C, Fontes J, Mendoza N, Martínez L, Expósito A.:** Aborto Inmunológico: ¿Realidad o Falacia?. Revista ASEBIR 1999; 4: 11-16.

2. **Eaton JW, Mayer AJ.:** The social biology of very high fertility among the hutterites: The demography of a unique population. *Hum Biol* 1963; 25: 206.
3. **Eklund AC, Belchak MM, Lapidus K, Raha-Chowdhury R, Ober C.:** Polymorphisms in the HLA-linked olfactory receptor genes in the hutterites. *Hum Immunol* 2000; 61: 711-717.
4. **Ferstl R, Eggert F, Westphal E, Zavazava N, Muller-Ruchholtz W.:** MHC-related odors in humans. In: Doty RL, Müller-Schwarze D (eds). *Chemical signals in vertebrates*. New York: Plenum 1992; 6: 205-211.
5. **Guttmacher AF.:** Factors affecting normal expectancy of conception. *JAMA* 1956; 161: 855.
6. **Hostetler JA.:** History and relevance of the hutterite population for genetic studies. *Am J Med Genet* 1985; 22: 453-462.
7. **James WH.:** Secular trends in monitors of reproductive hazard. *Hum Reprod* 1997; 12: 417-421.
8. **Nonaka K, Miura T, Peter K.:** Low twinning rate and seasonal effects on twinning in a fertile population, the Hutterites. *Int J Biometeorol* 1993; 37: 145-150.
9. **Nonaka K, Miura T, Peter K.:** Recent fertility decline in Dariusleut hutterites: an extension of Eaton and Mayer's hutterite fertility study. *Hum Biol* 1994; 66: 411-420.
10. **Ober C.:** Studies of HLA, fertility and mate choice in a human isolate. *Hum Reprod Update* 1999; 5: 103-107.
11. **Ober C, Hauck WW, Kostyu DD, O'Brien E, Elias S, Simpson JL, Martin AO.:** Adverse effects of human leukocyte antigen-DR sharing on fertility: a cohort study in a human isolate. *Fertil Steril* 1985; 44: 227-232.
12. **Ober C, Hyslop T, Hauck WW.:** Inbreeding effects on fertility in humans: Evidence for reproductive compensation. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 225-231.
13. **Ober C, Weitkamp LR, Cox N, Dytch H, Kostyu D, Elias S.:** HLA and mate choice in humans. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 497-504.
14. **Salvatierra V.:** Sobre la eficiencia de la reproducción humana. *Actual Obst Gin* 1968; 8: 81-93.
15. **Sato T, Nonaka K, Miura T, Peter K.:** Trends in cohort fertility of the dariusleut hutterite population. *Hum Biol* 1994; 66: 421-431.
16. **Robertson A, Charlesworth D, Ober C.:** Effect of inbreeding avoidance on Hardy-Weinberg expectations: Examples of neutral and selected loci. *Genet Epidemiol* 1999; 17: 165-173.
17. **Robinson WC.:** Another look at the hutterites and natural fertility. *Soc Biol* 1986; 33: 65-76.
18. **Weitkamp LR, Ober C.:** Ancestral and recombinant 16-locus HLA haplotypes in the Hutterites. *Immunogenetics* 1999; 49: 491-497.

19. **Yamazaki K, Boyse EA, Mike V et al.:** Control of mating preferences in mice by genes in the major histocompatibility complex. *J Exp Med* 1976; 144: 1324-1335.
20. **Yamazaki K, Yamaguchi M, Andrews PW, Peake B, Boyse EA.:** Mating preferences of F2 segregants of crosses between MHC-congenic mouse strains. *Immunogenet* 1978; 6: 253-259.
21. **Yamazaki K, Beauchamp GK, Kupniewski D, Bard J, Thomas L, Boyse EA.:** Familial imprinting determines H-2 selective mating preferences. *Science* 1988; 240: 1331-1332.
22. **Ziegler A, Ehlers A, Forbes S et al.:** Polymorphisms in olfactory receptor genes: a cautionary note. *Hum Immunol* 2000; 61: 1281-1284.

Estudio genético de la pareja estéril/infértil

Egozcue J

Dept. de Biología Celular, Universitat Autònoma de Barcelona

El estudio genético de la pareja estéril o infértil es complejo y asimétrico, debido a las características peculiares de cada sexo (Egozcue y col., 2000a), y se inicia a partir del primer contacto con la pareja. Aquí, analizamos el protocolo a seguir de forma escalonada, resumida y dando en cada caso las indicaciones que creemos más convenientes. Es obvio que el estudio genético hace referencia principalmente (pero no necesariamente) a casos de esterilidad o de infertilidad de origen desconocido. Por supuesto, no incluimos en esta breve revisión casos que por su rareza deben considerarse en un tratado de genética.

ANAMNESIS

La historia clínica nos pondrá sobre aviso de posibles causas de origen genético. En esta fase es posible detectar si uno de los miembros de la pareja sufre una enfermedad genética, la posible existencia de antecedentes familiares de enfermedades genéticas o de cromosopatías, el nacimiento previo de hijos afectados de una enfermedad genética o de una anomalía cromosómica, si los miembros de la pareja son consanguíneos, si padecen una esterilidad o una infertilidad, si se han producido abortos espontáneos, si éstos son o no de tipo recurrente, en qué momento de la gestación se han producido, si los miembros de la pareja han tenido hijos con otro cónyuge, y si algún familiar padece problemas reproductivos.

En este preciso momento, de todos los antecedentes citados el único que precisa atención inmediata es la existencia de una enfermedad genética que afecte a uno de los miembros de la pareja o a algún familiar, y que obligará a obtener un diagnóstico preciso, en caso de que no exista, a averiguar si es posible detectar para el proceso en cuestión el estado de portador, y a estimar el riesgo de transmisión del proceso,

su tipo de herencia, dominante, recesivo, ligado al sexo, relacionado con una mutación dinámica, expresividad, penetrancia, etc. Los demás aspectos se tratan sucesivamente.

EXPLORACIÓN FÍSICA

En la mujer, los datos derivados de la exploración física pueden orientar a la existencia de una enfermedad genética (ya tratado) o de una anomalía cromosómica (ver más adelante)

En el varón existen dos signos de gran importancia. En primer lugar, la ausencia bilateral (o unilateral) congénita de deferentes (ABCD) como signo de fibrosis quística (Welsh y col., 1995; Lissens y col., 1996), que obliga a llevar a cabo un estudio de mutaciones del gen CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) en el varón y, en caso de ser positivo, también en la mujer.

Al existir más de 900 mutaciones conocidas del gen, es necesario solicitar en cada caso el estudio de las mutaciones más frecuentes en el grupo poblacional del que procede cada uno de ellos (Casals y col., 1997), ya que sus frecuencias y tipos varían.

Otro dato de importancia es el tamaño, volumen y consistencia testicular, que puede orientar hacia un diagnóstico de Klinefelter o variante.

Obviamente, existen anomalías de los caracteres sexuales secundarios que pueden también orientar el diagnóstico.

ANALÍTICA DE BASE

Entre los estudios a solicitar en la analítica de base debe incluirse siempre un análisis del cariotipo de ambos miembros de la pareja (Egozcue, 1994). Como

es sabido desde hace muchos años, las poblaciones con problemas de fertilidad presentan una incidencia de anomalías cromosómicas detectables en el cariotipo unas 10 veces superior a la población en general (Zuffardi y Tiepolo, 1982). En el caso del síndrome de Klinefelter con cariotipo 47,XXY o en mosaico 46,XY/47,XXY esta incidencia es mucho mayor.

La presencia de reorganizaciones cromosómicas equilibradas tanto en el varón como en la hembra es causa frecuente de abortos recurrentes, e incluso de esterilidad.

En el varón deben valorarse las cifras elevadas de FSH y la existencia de anomalías en los seminogramas. Así, p. ej., la presencia de una oligoastenoteratozoospermia severa se han relacionado con la posible presencia de anomalías cromosómicas (anomalías de apareamiento de los cromosomas) en la meiosis, que tan sólo son detectables mediante un estudio meiótico en biopsia testicular (Vendrell y col., 1999; Egozcue y col., 2000b).

Una vez establecidos estos parámetros básicos (posibles antecedentes o existencia de enfermedades genéticas, cariotipo), el estudio genético de la mujer termina, y tan sólo se reanuda, en su caso, con motivo del asesoramiento genético, en caso de que se proponga un estudio preimplantacional o prenatal.

En el varón, en cambio, existen otras pruebas posibles o necesarias (Egozcue y col., 2000).

Si el cariotipo es anormal

En pacientes con una anomalía numérica de los cromosomas sexuales 46,XY/47,XXY (los 47,XXY puros no producen espermatozoides) o 47,XXY (Blanco y col., 1997, 2001):

1. En función de las características del testículo, puede realizarse un estudio meiótico para determinar la configuración de apareamiento de los cromosomas sexuales o,
2. Llevar a cabo una valoración del porcentaje de espermatozoides con disomías de los cromosomas sexuales por FISH.

Si el paciente es portador de una reorganización cromosómica equilibrada, es necesario establecer el riesgo de transmisión de una anomalía a la descendencia mediante:

1. Un estudio de la meiosis en biopsia testicular, que en caso de riesgo elevado (dependiendo de la configuración meiótica del multivalente) puede completarse con
2. Un estudio de la segregación meiótica de los cromosomas implicados por FISH (Egozcue y col., 1997).

Si el cariotipo es normal

Teniendo en cuenta que los varones estériles o infértiles presentan un riesgo de sufrir una anomalía cromosómica (sináptica) en un 4-8% de los casos (Egozcue y col., 1983), cifra que se incrementa a un 18% en casos de oligozoospermia severa (Egozcue y col., 2000b), es necesario

1. Un estudio de la meiosis en biopsia testicular, para detectar la posible presencia de una anomalía sináptica, que puede completarse con
2. Un estudio de anomalías cromosómicas en los espermatozoides por FISH.

En caso de que el cariotipo sea normal, pero en función de las características de los seminogramas, las pruebas anteriormente indicadas deben matizarse o completarse de la forma siguiente:

Azoospermia por ABCD o AUCD

1. Estudio de las mutaciones del gen CFTR, que de ser positivo debe realizarse también en la mujer.

Azoospermia secretora

1. Microdeleciones del cromosoma Y (se encuentran deleciones del Y en un 18% de azoospermicos) (Oliva y col., 1998; Liow y col., 2001). En ausencia de deleciones:
2. Meiosis en biopsia testicular (se encuentran anomalías sinápticas en un 4-8 % de azoospermicos).

Oligo(astenoterato)zoospermia severa (1.5x10⁶/ml)

1. Meiosis en biopsia testicular (se encuentran anomalías sinápticas en un 18-23 % de pacientes)
2. Si existen anomalías meióticas y el número de espermatozoides lo permite, FISH de espermatozoides. Recientemente algunos artículos han relacionado la asteno y la teratozoospermia (que genéticamente se consideraban menos relevantes) con un incremento de anomalías cromosómicas en los espermatozoides. Si no existen anomalías meióticas,
3. Microdeleciones del cromosoma Y (existen deleciones del Y en alrededor de un 2% de oligozoospermias)

Otras anomalías del seminograma

1. Meiosis en biopsia testicular (existen anomalías sinápticas en un 4-8% de pacientes) (Egozcue y col., 1983). Si hay anomalías meióticas;
2. FISH de espermatozoides. En caso de que no se detecten anomalías meióticas,

3. Microdeleciones del cromosoma Y (poco frecuentes).

Finalmente, establecida si es posible la causa de la infertilidad o la esterilidad de la pareja, hay que proceder al asesoramiento genético. En la actualidad, y según las características de cada caso, es posible ofrecer a las parejas los tipos de estudio que se detallan a continuación. En casos de elevado riesgo genético o con una historia obstétrica que incluya interrupciones del embarazo, están indicados los estudios preimplantacionales; si el riesgo es bajo, es más lógico recurrir a estudios genéticos prenatales. En todo caso, es la pareja quien debe decidir, en función de las prestaciones que ofrezca el sistema sanitario:

1. Si la mujer es portadora de una enfermedad genética, de una anomalía cromosómica numérica (p. ej., 47,XXX, síndrome en que es frecuente una menopausia precoz) o de una reorganización cromosómica, puede llevarse a cabo un diagnóstico genético preimplantacional utilizando el primer corpúsculo polar (PGD 1PB). En este caso, el diagnóstico se realiza después de proceder a una ICSI (Durban y col., 2001), y en caso necesario el diagnóstico puede confirmarse o completarse mediante estudio del 2PB o de blastómeros del embrión en fase de 6-8 células.
2. El tipo de diagnóstico preimplantacional más utilizado es el basado en el análisis de uno o dos blastómeros por PCR o mediante FISH (ESHRE PGD Consortium Steering Committee, 2002).
3. Si el riesgo genético es bajo, parece más lógico recurrir a un diagnóstico prenatal clásico, sea utilizando una biopsia corial o líquido amniótico.

Además, hay que señalar que el uso del cribado genético preimplantacional o preimplantation genetic screening (PGS) puede resultar útil para conseguir un embarazo en parejas con una historia de abortos recurrentes (Pellicer y col., 1999), en portadores de reorganizaciones cromosómicas, y quizá incluso en mujeres de edad avanzada (Egozcue y col., 2002, en prensa).

BIBLIOGRAFÍA

1. **Blanco J, Rubio C, Simón C et al.:** Increased incidence of disomic sperm in a 47, XYY male assessed by fluorescent in situ hybridization (FISH). *Hum. Genet.* 1997; 99:413-416.
2. **Blanco J, Egozcue J, Vidal F.:** Meiotic behaviour of the sex chromosomes in three patients with sex chromosome anomalies (XYY, mosaic XY/XYY and XYY) assessed by FISH. *Hum. Reprod* 2001; 16: 887-892.
3. **Casals T, Ramos MD, Giménez J et al.:** High heterogeneity for cystic fibrosis in Spanish Families: 75 mutations account for 90% of chromosomes. *Hum. Genet* 1997; 101:365-370.
4. **Durban M, Benet J, Boada M et al.:** PGD in female carriers of balanced Robertsonian and reciprocal translocations. *Hum. Reprod* 2001; Update 7: 591-602.
5. **Egozcue J.:** Estudio citogenético, en: *Práctica Andrológica*. Pomerol J, Arrondo JL (eds.), 1994; pp. 146-153. Masson-Salvat, Barcelona.
6. **Egozcue J, Templado C, Vidal F et al.:** Meiotic studies in a series of 1100 infertile and sterile males. *Hum. Genet* 1983; 65:185-188.
7. **Egozcue J, Blanco J, Vidal F.:** Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum. Reprod* 1997; Update 3:441-452.
8. **Egozcue J, Rajmil O, Bassas LI et al.:** Criterios para la indicación de estudios cromosómicos especiales en la infertilidad y la esterilidad masculina. *Urol* 2000 ;Integr. Invest. 5:16-19,
9. **Egozcue J, Santaló J, Giménez C, et al.:** Preimplantation genetic screening and human implantation. *J. Reprod. Immunol* 2002; (en prensa).
10. **Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM et al.:** Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum. Reprod* 2000a; Update 6:93-105.
11. **Egozcue S, Vendrell JM, García F, et al.:** Increased incidence of meiotic anomalies in oligoasthenozoospermic males preselected for intracytoplasmic sperm injection. *J. Assist. Reprod. Genet* 2000b; 17:307-309.
12. **ESHRE PGD Consortium Steering Committee:** ESHRE Preimplantation Diagnosis Consortium: data collection III (May 2001). *Hum. Reprod* 2002; 17: 233-246.
13. **Liow SL, Yong EL, Ng SC.:** Prognostic value of Y deletion analysis. How reliable is the outcome of Y deletion analysis in providing a sound prognosis?. *Hum. Reprod* 2001; 16:9-12.
14. **Lissens W, Mercier B, Tournaye H et al.:** Cystic fibrosis and infertility caused by congenital bilateral absence of the vas deferens and related clinical entities. *Hum. Reprod* 1996; 11 (Suppl. 4):55-78.
15. **Oliva R, Margarit E, Balleescá JL et al.:** Prevalence of Y chromosome microdeletions in oligospermic and azoospermic candidates for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril* 1998; 70:506-510.

16. **Pellicer A, Rubio C, Vidal F et al.:** In vitro fertilization plus preimplantation genetic diagnosis in patients with recurrent miscarriage: an analysis of chromosome abnormalities in human preimplantation embryos. *Fertil. Steril* 1999; 71:1033-1039.
17. **Vendrell JM, García F, Veiga A et al.:** Meiotic abnormalities and spermatogenic parameters in severe oligoasthenozoospermia. *Hum. Reprod* 1999; 14:375-378.
18. **Welsh MJ, Tsui LC, Boat TF et al.:** Cystic fibrosis, en *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds.) 7ª ed. pp. 3799-3876. McGraw-Hill, New York, 1995.
19. **Zuffardi O, Tiepolo L.:** Frequencies and types of chromosome abnormalities associated with human male infertility, en: *Genetic Control of Gamete Production and Function*. Crosignani PG, Rubin BL (eds.) pp. 261-273. *Serono Clinical Colloquia on Reproduction III*. 1982; Academic Press, London.

Ecografía y Reproducción

Bajo Arenas J M.

Catedrático de Obstetricia y Ginecología de la Universidad Autónoma de Madrid. Jefe de Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario Sta. Cristina de Madrid.

Cada vez son más las aplicaciones dentro del campo de la reproducción, hasta tal punto que difícilmente pueden resumirse dentro de una ponencia. Para llevar un orden y aún a sabiendas que muchas cosas se quedarán en el tintero las dividiremos en:

1. Estudio pelvis en exploraciones esterilidad
2. Ecograma ovárico basal
- 3- Valoración del ciclo ovárico natural
- 4- Trastornos ovulación
- 5- Valoración ciclo estimulado
- 6- Valoración del ciclo endometrial
- 7- Captación de ovocitos
- 8- Ayuda a la transferencia embrionaria en fertilización in vitro
- 9- Diagnóstico de gestación y desarrollo inicial

1. ESTUDIO DE LA PELVIS EN EXPLORACIONES ESTERILIDAD.

La primera ecografía dentro del estudio básico de esterilidad servirá para informarnos de la existencia de patología orgánica concomitante causante o no de la esterilidad pero que es útil conocer y para pautar todas las restantes pruebas. Patología orgánica diagnosticable:

- a) Endometriosis,
- b) Hidrosálpinx,
- c) Pólipos endometriales
- d) Miomas
- e) Malformaciones uterinas, etc.

a) Endometriosis

Características sonográficas de los de los endometriomas:

* Formaciones ováricas uniloculares o multiloculares no tabicadas.

* Se aprecia una pared claramente o existe un límite más o menos nítido con el estroma circundante. Es importante evidenciar pequeños focos hiperecogénicos en el límite del endometrioma.

* Ausencia o muy escaso mapa color en la pared. Puede existir mapa color periférico.

* Ausencia de papilas.

* Tamaño generalmente inferior a 5cm de diámetro.

* Contenido denso sin tractos lineales en su interior

Antes clasificábamos los endometriomas según su apariencia en grupos pero con el advenimiento de la nueva tecnología de alta resolución se ha podido comprobar que manejando los armónicos en el estudio de las diversas densidades los endometriomas denominados por nosotros en el pasado de tipo 1, con contenido en principio sonoluscente son endometriomas con un contenido homogéneo menos denso pero no tan hipoecogénico como una formación folicular.

La confirmación debe ser laparoscópica pero es la ecografía la que nos pone sobreaviso.

b) Hidrosálpinx

Es la secuela más frecuente de la EIP. Tras un proceso inflamatorio o infeccioso agudo en cualquiera de las fases antes descritas y con un tratamiento médico adecuado, el proceso puede curarse con eliminación de los gérmenes aerobios y anaerobios causantes de la enfermedad. Si se trataba de una salpingitis aguda puede evolucionar con "restitutio ad integrum" pero en cuanto la enfermedad se halle un poco más avanzada y sobre todo en los casos de Estadios III, esto ya no es posible y nos encontramos con colecciones de líquido sin gérmenes dentro de la trompa. Es el llamado hidrosálpinx. Desde el punto

de vista ecográfico se identifica una estructura tubular alargada, con una pared fina por la mucosa atrófica y, contenido sonoluscente (rasgo característico). Las lesiones de la mucosa tubárica dependerán de la gravedad del proceso pero la sonolusencia del contenido crean una ventana acústica que permite visualizar, mejor si cabe los signos antes descritos, como escasos resaltes en el borde interno del hidrosálpinx (signo del collar de perlas) o si la trompa dilatada alcanza el suficiente tamaño se dobla sobre sí misma (signo del septo incompleto).

Histerosalpingosonografía

El principal propósito de la histerosonografía en referencia a la patología tubárica era la sustitución de la histerosalpingografía en el análisis de las trompas. Los resultados publicados son interesantes e incluso autores como I. Goldstein o H. Yarali han complementado su uso con el Doppler sin embargo la técnica ecográfica proporciona menos información sobre morfología de la trompa, sobre su estructura interna y sobre el lugar de la obstrucción. El análisis de los últimos artículos sobre histerosonografía pone de manifiesto que en la actualidad, la mayoría de los autores utiliza esta técnica en análisis de patología endocavitaria, recurriendo todavía a la histerosonografía y a la cromoperturbación como técnicas de referencia para demostrar la permeabilidad tubárica. Para comprobar la permeabilidad tubárica se ha propuesto la introducción de un líquido (suero salino o contraste ecográfico) a través del cérvix (histerosonografía). Mediante este procedimiento se visualiza el paso de contraste, y el líquido libre en la cavidad peritoneal si es permeable. Sin embargo su utilización no se ha extendido por que no da información de cómo es este paso y por lo tanto no ha sustituido a la histerosalpingografía como método de referencia en valorar la patología tubárica.

c) Pólipos

El diagnóstico de pólipos endometriales es de importancia fundamental porque en la mayoría de los casos no es diagnosticable por la exploración física o y el legrado puede fracasar en su extirpación ignorándolo, lo que explica la persistencia ó recurrencia de síntomas, por lo que es preciso encontrar un medio de diagnóstico seguro y eficaz. La ecografía vaginal ha supuesto un avance en el diagnóstico no invasivo del pólipo endometrial aportando una serie de signos característicos (tabla 1)

Nosotros realizamos un estudio prospectivo sobre

Tabla 1
Imagen ecográfica típica de pólipo

- Una masa hiperecogénica intraluminal,
- Bien definida. Bordes regulares conteniendo o no áreas quísticas (línea ecorrefringente que refleja la interfase entra el pólipo y la pared uterina sobre la que se apoya (Pérez-Medina).
- Pedículo.

61 mujeres que acudieron a la consulta de esterilidad con el objeto de determinar la eficacia de la ultrasonografía transvaginal en el diagnóstico de pólipos endometriales, según el cual a todas las enfermas con sospecha de pólipo endometrial en la ecografía transvaginal de rutina, al visualizarse en la exploración una imagen hiperecogénica de contornos regulares que ocupaba parcial o totalmente la luz uterina, eran remitidas a la consulta de histeroscopia donde les era realizada esta prueba, asociada a biopsia dirigida, considerando el resultado como “patrón-oro” para el diagnóstico de esta patología (Pérez-Medina).

La ecografía transvaginal y la histeroscopia fueron realizadas por distintos exploradores, no sabiendo los segundos los resultados ultrasonográficos de cada enferma, analizándose los hallazgos conjuntamente al finalizar el estudio, determinándose la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y eficacia de la prueba.

De las 61 enfermas del estudio, se emitió el diagnóstico de pólipo endometrial mediante histeroscopia en 10 pacientes.

Al realizar la ecografía transvaginal se emitió el diagnóstico de pólipo endometrial en 14 enfermas, confirmándose por histeroscopia el diagnóstico en 9 de ellas, presentando las 5 restantes otra patología. La histeroscopia informó de pólipo endometrial en 1 casos en los que el ecografista había emitido otro diagnóstico.

La sensibilidad de las ecografías transvaginal para el diagnóstico de pólipo endometrial resultó ser del 92.3%, la especificidad del 90.2%, el VPP del 64.2% y el VPN 98.4%²⁵.

d) Miomas y malformaciones uterinas también pueden ser diagnosticados por ecografía en esta primera exploración

e) Finalmente nos servirá para la programación del resto del estudio, y constatar la validez de las otras pruebas diagnósticas que sin la ecografía carecen de valor:

1. Las determinaciones de FSH, LH y estradiol

basales deben ser realizadas cuando el ovario se encuentra en situación basal ecográficamente.

2. EL test postcoital se realizará en fase preovulatoria.

3. Las determinaciones de progesterona en segunda fase precisan la constatación de la ruptura folicular para poder afirmar que el ciclo es ovulatorio.

La ecografía es por tanto un pilar básico en la programación del protocolo diagnóstico de la paciente estéril.

2- ECOGRAMA BASAL

La ecografía basal debe contar el número de formaciones sonolucientes redondeadas (folículos) que tiene una mujer en el momento del inicio de la regla, cuando empieza la fase del ciclo dependiente de las gonadotropinas. Las situaciones que podemos encontrarnos son:

A. Ausencia total de formaciones sonolucientes.

Nos indica ausencia de folículos por estar los ovarios en fase menopáusica, fallo ovárico primario o si son folículos primordiales sin ningún antro (líquido) que es lo que determina la sonolucencia, en la infancia.

A -1 a 4 Formaciones sonolucientes (folículos) en cada ovario, fisiológico en la mujer en edad reproductiva.

B. Ovarios multiquísticos:

5-10 formaciones sonolucientes en la perifería. Su tamaño suele ser mayor que el de los folículos antrales del ovario normal. El estroma no está aumentado. Se da en la pubertad y en mujeres sometidas a regímenes para pérdida de peso. Aparecen como consecuencia de una producción reducida de GnRH con disminución de gonadotropinas. Las determinaciones hormonales son normales y el hallazgo es sonográfico.

C. Ovarios poliquísticos:

Más de 10 formaciones sonolucientes en cada ovario, situados en la periferia, con aumento del estroma y del volumen del ovario, así como alteraciones hormonales con LH > FSH

Es la única prueba que nos permite distinguir entre insuficiencia ovárica primaria y ovario resistente a gonadotropinas. Puede superar a la biopsia ovárica cómo señala Metha ya que no se puede excluir por la

ausencia de folículos en una zona, que estos no se encuentren en otra zona del parénquima ovárico, a lo que añadiríamos el inconveniente potencial de la formación de adherencias y el riesgo de provocar esterilidades secundarias de origen mecánico.

2-VALORACIÓN DEL CICLO OVÁRICO NATURAL

La anovulación, se da en un 7% de ciclos en mujeres en edad reproductiva, pero en algunas pacientes con alteración de la función hipotálamo hipofisaria, o con alteraciones ováricas severas, la anovulación puede ser crónica. Por otra parte, anomalías menos marcadas en la función hipotálamo hipofisaria, pueden dar lugar a alteraciones en el desarrollo folicular y en la fase lútea. Podemos decir, que globalmente, la anovulación y las disfunciones ovulatorias constituyen entorno a un 25% en la etiología de la esterilidad de origen femenino.

Los ultrasonidos, nos permitirán seguir el desarrollo y crecimiento de los folículos desde el momento en que estos se vuelven sensibles a las gonadotropinas. En los primeros momentos del desarrollo folicular los niveles de estradiol no se elevan, siendo la ecografía otra vez, la única capaz de seguir el crecimiento folicular en las primeras fases de desarrollo. El conocimiento de la situación en estas primeras fases, es también indispensable para determinar la dosis de gonadotropinas eficaz en los ciclos de estimulación ovárica. La ecografía es capaz de diagnosticar las alteraciones de la ovulación, como es el caso la falta total de desarrollo folicular, los folículos antrales o dominantes que crecen y luego se atresian, la luteinización sin ruptura folicular (LUF), y los folículos persistentes (ausencia de luteinización).

Por último, los ultrasonidos, permiten una visualización y valoración del cuerpo lúteo, siendo una herramienta importante a la hora de valorar la fase lútea y su patología.

La investigación de los cambios circulatorios en el útero y ovarios, durante el ciclo menstrual normal y estimulado, con tecnología Doppler, constituye hoy día un importante complemento al estudio ecográfico, de la mujer estéril, buscando un nexo entre anatomía y función. Cualquier órgano, depende para su correcto funcionamiento de un adecuado aporte de oxígeno y nutrientes. El ovario, es uno de los órganos más vascularizados del organismo, recibiendo hasta un 0.2% del gasto cardíaco en algunas especies, lo que supone 7 veces más flujo sanguíneo, que órganos tan importantes como el hígado ó el cerebro. Con la in-

roducción de sondas equipadas con tecnología doppler color, podemos establecer una relación entre flujo y función de forma incruenta. Por otra parte, se a demostrado por múltiples autores la variación del flujo ovárico y uterino a lo largo del ciclo menstrual. Por todo ello, el doppler, aporta un complemento al estudio morfológico con ultrasonidos convencionales, en la evaluación del ciclo ovárico y endometrial.

De los estudios realizados, se deduce la importancia de la elección de la arteria a estudiar. Para poder tomar las medidas de flujo y poder establecer comparaciones, es imprescindible homogeneizar este parámetro. En nuestros protocolos de trabajo, medimos la onda de velocidad de flujo en la arteria ovárica, en el polo externo del ovario a nivel del ligamento infundíbulo pélvico. Cuando empleamos la arteria utero-ovárica, las medidas las tomamos a nivel del cuerno uterino, entre éste y la cara interna del ovario. En la arteria uterina el volumen de muestra se sitúa en un corte transversal a nivel del orificio cervical interno 1 cm por fuera de él. Aunque existen autores que evalúan las variaciones de flujo en estas arterias, las medidas son más fiables y ofrecen mayor variación cíclica a nivel intraovárico e intramiometrial. En el circuito intraovárico, ponemos el volumen de muestra en el estroma, lo más cerca posible de la pared del folículo dominante o del cuerpo lúteo, y en el ovario contralateral donde se visualice señal color dentro del estroma. A nivel intramiometrial, si queremos explorar las arcuatas, situamos el volumen de muestra, en un corte transversal alejándonos lo más posible de las uterinas, pero separados 2-3 mm de la serosa peritoneal, para no confundirnos con ramas centripetas de las arcuatas que son de mayor resistencia. Para valorar las radiales, barremos el espesor miometrial entre el nivel de las arcuatas y 2 mm de la línea externa del endometrio. Por último para valorar las rectas o las espirales, las determinaciones se realizan a 1 mm o menos de la unión endometrial, si queremos estar seguros de que son espirales la obtención de la onda se debe realizar intraendometrial, lo cual no es posible en la gran mayoría de los casos debido al calibre mínimo de estas arterias terminales. Tanto a nivel intraovárico, como intramiometrial, nunca podremos tener la certeza de cual es el vaso explorado, debido a la anarquía anatómica que caracteriza estas redes vasculares, por ello es conveniente tomar fotos de la zona insonada, haciendo siempre la medida en la misma zona, con el mismo corte, y realizando varias determinaciones para obtener el valor medio.

En el ciclo ovárico, podemos distinguir la fase de desarrollo folicular, la preovulatoria y la fase lútea. Estas 3 etapas, se asocian a cambios ecográficos pa-

ralelos bien caracterizados, de forma que a través de la ecografía, podemos colegir en que momento del ciclo nos encontramos. A su vez, en el curso del desarrollo folicular vamos a distinguir 3 etapas: Reclutamiento, Selección y Dominancia, cada una de las cuales, va a tener, como ya hemos dicho unas determinadas características ecográficas.

Reclutamiento:

En la parte final de la fase lútea, y al comienzo de la fase folicular existe un aumento progresivo de la FSH hipofisaria, que tiene como consecuencia, el que una serie de folículos que están en fase de sensibilidad a las gonadotrofinas entren en crecimiento, saliendo del estadio de diplotene en el que se hayan detenidos. Este grupo de folículos en desarrollo lo denominamos cohorte. Durante esta fase, el crecimiento es variable. En general, los folículos crecen muy lentamente (fase de latencia), a razón de 0.5-1 mm al día. En cada ovario pueden verse una cohorte de 2 a 5 folículos antrales, cuyo tamaño oscila entre 3 y 7 mm habitualmente. No se puede saber en esta fase cual es el ovario destinado a ovular, y a veces la ovulación se produce por el ovario con la cohorte menos numerosa. Estas cohortes de folículos, aparecen y desaparecen en cualquier fase del ciclo ovárico, así es posible observarlos en la fase lútea y menstrual, incluso cuando la mujer toma anticonceptivos orales o estando embarazada. Ello es debido, a que el inicio del desarrollo folicular es independiente en sus fases iniciales de los niveles de gonadotrofinas, pero llegado un punto del desarrollo adquieren esta sensibilidad, atresándose si no se tienen los niveles suficientes para proseguir su desarrollo.

Desde el punto de vista del Doppler a nivel intraovárico, apreciamos un incremento de flujo con respecto a la fase lútea precedente, sin que se pueda observar diferencias entre los dos ovarios.

Selección:

Es el momento en que se decide de entre los folículos de la cohorte, cual es el destinado a ovular. La selección se hace gracias a una disminución de los niveles de FSH, y a factores intraováricos. Todo ello hace posible que el folículo que haya desarrollado más receptores a FSH sea el elegido. Intervienen también procesos de neoangiogénesis y aumento del flujo sanguíneo. Así mismo la capacidad de producir estrógenos en las células de la granulosa, las cuales producen también un aumento en la producción del líquido folicular, que trae como consecuencia un cambio en

la trayectoria de crecimiento. Cuando farmacológicamente en el curso de los ciclos estimulados, suprimimos esta disminución de FSH, prosigue la fase de reclutamiento y no se produce la fase de selección, con lo que se producirá el desarrollo folicular múltiple buscado en las distintas técnicas de reproducción asistida. A medida que va aumentando el tamaño del folículo, aumentan los niveles de estradiol, existiendo múltiples trabajos que corroboran la buena correlación entre tamaño folicular y estradiol plasmático, que evolucionan de forma paralela y simultánea aunque independiente, tanto en ciclos naturales como en estimulados con clomifeno o gonadotrofinas. La selección del folículo que será el dominante, suele realizarse en los días 5 a 7 del ciclo, pero no podremos detectarla a ecográficamente hasta los días 8 a 11. En esta fase de selección el diámetro folicular está alrededor de los 6-10 mm, y el crecimiento es más uniforme y se realiza a razón de 1-2 mm diarios.

Desde el punto de vista del Doppler observaremos una estabilización del flujo intraovárico. En ocasiones, especialmente si empleamos power Doppler, podremos ya en esta fase registrar un incremento en la vascularización perifolicular de los folículos seleccionados.

Dominancia:

Es el momento en el que el folículo destinado a ovular toma el mando del ciclo. El control se desarrolla a partir de un aprovisionamiento de FSH, adquisición de los receptores a LH, la amplificación de la respuesta a la FSH-LH, y la producción de inhibina que induce atresia en los demás folículos.

El crecimiento en esta fase se acelera, indicando que el folículo ha adquirido la dominancia. Crece a razón de 2-3 mm al día. El tamaño del folículo dominante suele ser mayor de 10 mm, y la diferencia con los otros folículos mayor de 2 mm. Respecto a los folículos acompañante del resto de la cohorte, cuyo número es máximo los días 4 a 7 del ciclo, su cantidad disminuye conforme avanza la fase folicular, especialmente en el ovario dominante, permaneciendo igual en el contralateral. Al final de la fase lútea, el número de folículos antrales se comienza a elevar de nuevo. El volumen del ovario también se va incrementando en el ovario destinado a ovular, y se mantiene invariable en el contralateral.

Desde el punto de vista del Doppler, observaremos un cambio del flujo intraovárico, apreciándose una mayor cantidad de flujo a nivel del ovario que va a ovular, permaneciendo constante en el contralateral.

Desde el inicio de la década de los 80, se demos-

tró que la ecografía podía competir con ventaja con las determinaciones hormonales de estradiol, FSH y LH, como herramienta para predecir el momento de la ovulación. Así mismo, múltiples trabajos han establecido una buena correlación entre diámetro folicular y niveles de estradiol. Han sido varios los signos ecográficos descritos que nos ayudan a predecir en que momento el folículo ha alcanzado su madurez, y está listo para recibir la descarga preovulatoria de LH, que reanuda la madurez nuclear e iniciará los procesos de digestión de la pared del folículo, culminando con la expulsión de un ovocito en estadio de metafase II, listo para ser fertilizado. Entre los signos de madurez el ecografista tendrá que valorar:

-Aceleración del crecimiento de 3-4 mm diarios, en los días que anteceden a la ovulación.

- El tamaño final del folículo, que suele oscilar en ciclos naturales entre 18 y 26 mm, con una media de 22 mm. Autores llegaron a establecer unas tablas que relacionaban tamaño del diámetro folicular y tiempo de ovulación, viendo que el tiempo oscilaba entre 0.75 y 3.75 días cuando el tamaño era de 20 mm. Tenemos que tener en cuenta, que esta medida es mayor en ciclos estimulados con clomifeno, y menor en ciclos estimulados con gonadotrofinas, donde la media es de 18 mm. Cuando existe un desarrollo folicular múltiple, y añadimos análogos de GnRH se puede observar madurez folicular con diámetros de 16 mm. No obstante, a igualdad de madurez del ovocito Andreani demuestra un grado de actividad celular en células provenientes de folículos más grandes, que se traduciría en una actividad de aromatización más elevada, con niveles más altos de estradiol y progesterona en los cultivos. Son varias las maneras de medir un folículo. La forma más sencilla y perfectamente válida cuando el folículo es de forma ovoidea, es medir los 2 diámetros mayores, es menos complicada y ofrece los mismos resultados que medir 3 diámetros o el volumen del folículo. Cuando es completamente esférico bastaría con medir un solo diámetro. En cualquier caso, pensamos que hay una considerable variación entre el diámetro folicular y el tiempo de ovulación, y que también existe variación en el tamaño que indica madurez folicular oscilando entre 16 y 33 mm.

-Descrito por primera vez por Hackeloer en los momentos que anteceden a la ovulación, es posible ver en algunos casos una masa ecogénica, adherida a la pared del folículo, esta imagen se supone que representa al cúmulo ooforo. Otros autores, lo han descrito como una masa ecogénica con un área sonoluscente en su interior. Hay estudios que sugieren que la ovulación se producirá 36 horas después de la visualización ecográfica del cúmulo. La constancia de su vi-

sualización, varía entre un 80 y un 23% según los distintos autores. Hay autores que niegan la posibilidad de visualización del cúmulo, alegando que su tamaño no alcanza el límite de resolución de los ultrasonidos, e interpretan la presencia de esta ecorrefringencia como un artefacto. En nuestra opinión, es posible su visualización, ya que el tamaño del cúmulo ronda los 2-3 mm, y lo hemos podido detectar en un 26,6% de casos en ciclos naturales.

-Como consecuencia de la acción enzimática inducida por la LH, se desprenden células de la granulosa, que flotan en el líquido folicular confiriéndole un aspecto ecográficamente turbio, que se manifiesta como un líquido más ecogénico y con finos ecos intrafoliculares. Por la misma acción de la LH la pared se adelgaza en algunos puntos, aunque se puede ver engrosada en otros puntos como consecuencia del aumento de la capa de las células de la granulosa. La alternancia de zonas engrosadas y otras adelgazadas, le confiere el aspecto de pared dentada.

Después del pico de LH, la teca se vuelve hipervascularizada y edematosa, comenzando la separación entre las células de la granulosa y de la teca. Como manifestación de esta separación, se puede apreciar un halo hipocogénico que rodea el folículo, debido a un descenso de reflectividad entre las 2 capas. El tiempo que pasa entre la aparición del signo del halo y la ovulación también ha sido objeto de controversia, y oscila entre 4 y 44 horas. Nosotros pensamos que es uno de los signos más específicos que indican madurez folicular, e indicaría ovulación próxima.

Desdichadamente, aunque todos estos signos han sido descritos como de ovulación inminente, actualmente no disponemos de ningún signo ecográfico que por sí solo nos indique el momento exacto de la ovulación. Debemos considerar, que todos los signos descritos solamente indican que el momento de la ovulación se encuentra próximo. Será la combinación de todos estos signos ecográficos, junto con los datos clínicos propios de cada paciente, los que en manos de un ecografista experimentado sean capaces de acercarnos con mucha precisión al momento de la ovulación. No obstante, cuando el ginecólogo se este iniciando en la programación de la administración de HCG para la realización de técnicas de reproducción asistida, por su sencillez nos quedaríamos con el tamaño folicular, que nos da por sí solo, una aproximación suficiente a la madurez folicular. Por otra parte, aunque el resto de los signos es posible verlos en ciclos de desarrollo multifolicular, son mucho más infrecuentes e inconstantes, debiéndonos guiar principalmente por el tamaño de los 2-3 folículos dominantes.

Ovulación

Son varios los signos ecográficos de ovulación pero es difícil en ocasiones asegurar que la ovulación se ha producido, sino hemos seguido el desarrollo del folículo a lo largo del ciclo. El único signo inequívoco de ovulación es la desaparición del folículo. Pero el vaciamiento del folículo no es siempre inmediato. Hanna, en un estudio sobre 25 ciclos, comprobó que el 70% del líquido folicular se expulsa en una media de 0.9 +/- 0.3 minutos, el 30 % del líquido restante es expulsado en una media de 6.1 +/- 1.1 minutos. El vaciamiento completo ocurrió en el 92% de los ciclos. Existen casos en los que el vaciamiento folicular es un proceso más lento, y no llega a ser total. Por ello, es también signo de ovulación la variación en el tamaño y forma del folículo. El aplanamiento, la pared irregular y engrosada con ecos intrafoliculares, deben ser interpretados como signo de ovulación. Otro signo, aunque más inconstante de ovulación es la aparición de líquido en Douglas, periuterino o periovárico (30). No es patognomónico, puesto que en ocasiones puede verse líquido en cavidad que proviene exudado peritoneal o folicular en ausencia de ovulación, siendo esto especialmente frecuente en ciclos con un exceso de estimulación.

Cuerpo lúteo

El cuerpo lúteo (CL), es de aparición inconstante. Conforme mejora la resolución de los aparatos empleados y la experiencia del ecografista su visualización es más frecuente, podemos decir que con las sondas de alta frecuencia debemos ser capaces de detectarlo en el 70% de los casos. Por otra parte, es más fácil verlo en fase mesolútea, donde alcanzamos a detectarlo en un 90% de los casos. La forma de presentación es también variable, de forma que podemos verlo como una estructura intraovárica estrellada hipocogénica o con finos ecos, y otras veces se presenta en forma quística, con un tamaño de unos 3 cm, econegativa y con pared engrosada e irregular. Cuando el CL es hemorrágico, se presenta como una masa de ecogenicidad heterogénea, predominantemente anecoica, con contenido ecogénico en su interior que representan coágulos. Poco a poco, los coágulos se organiza y se vuelve más ecogénico, en ocasiones ocupando todo el CL, en otras el coágulo se retrae, y se puede apreciar un área anecoica que representa suero. Entre estas dos formas caben todas las variedades posibles, de modo que el CL, se ha ganado a pulso el nombre del "gran simulador", pudiéndole confundirse con entidades tan dispares como un folí-

culo, un LUF, un endometrioma y hasta una neoplasia de ovario. La morfología del cuerpo lúteo cambia a lo largo de la fase lútea, como consecuencia de los fenómenos hemorrágicos y de neoangiogénesis que ocurren tras la ovulación, y la sustitución progresiva de las células granuloluteínicas por fibroblastos. Es precisamente el cambio de morfología del cuerpo lúteo a lo largo del ciclo, lo que facilita el diagnóstico diferencial con otros procesos tumorales y quísticos. Podemos decir, que los elementos constantes que lo constituyen son una pared ecogénica de grosor variable, y una parte central cuya ecogenicidad varía desde totalmente sonoluscente a hiperecoica completa.

Son normas básicas para el éxito final en el control de la ovulación y su patología, la resolución del equipo, los conocimientos científicos, el tiempo empleado y la integración en equipo. Respetando estas normas, podemos decir que la ecografía es la prueba fundamental para el control de la ovulación y su patología, ya que nos permite reunir en una sola prueba información sobre la reserva folicular, el desarrollo folicular, la ovulación y sus alteraciones, y valorar el cuerpo lúteo.

3. TRASTORNOS OVULACIÓN

Son fundamentalmente dos:

a) Formaciones foliculares persistentes.

Se caracterizan por la ausencia de ovulación y de desarrollo de la fase lútea, con la consiguiente producción de estrógenos durante un período variable y retraso de la menstruación, lo que puede originar una clínica de dolor pélvico agudo si la formación llega a romperse. Su incidencia es mayor en la adolescencia y perimenopausia.

Se produce una secreción mantenida de FSH, con ausencia de LH, lo que origina una formación cuyo tamaño suele superar los 30 mm de diámetro. En algunos estudios se observó como el tratamiento con ACO de dosis bajas a veces persisten folículos con un tamaño superior a 18 mm.

Comúnmente se diagnostica en el curso de un estudio de esterilidad ya que requiere de ecos seriadas y determinaciones hormonales. Sus características son:

Unilaterales, sonoluscentes, límites precisos, bordes regulares, pared fina, sin tabiques en su interior y asociados a engrosamiento endometrial. En caso de producirse torsión o hemorragia de dicha formación el aspecto sonográfico sería muy similar al del cuerpo lúteo hemorrágico.

La conducta ha de ser expectante con control ecográfico en 3 a 6 meses. En nuestra propia experiencia, desaparecen el 80 % de dichas formaciones en los primeros 6 meses.

Si el tamaño aumenta por encima de 6 cm o no disminuye tras tratamiento, se aconseja una PAAF, porque probablemente el diagnóstico no fue el correcto y estemos ante una formación no disfuncional.

b) Síndrome del folículo luteinizado no roto.

En este síndrome, no se evidencia la ruptura del folículo, pero si se observan signos de luteinización, reflejados estos en el aumento de la temperatura corporal basal y las determinaciones de progesterona.

Existen 2 mecanismos etiopatogénicos bien estudiados:

- 1) Origen central (eje hipotálamo-hipofisario)
- 2) Origen periférico (ovárico).

El mecanismo central se encuentra en una alteración preovulatoria de la LH que produce un fallo del inicio en la rotura folicular mediado por las prostaglandinas, con la consiguiente disminución en la luteinización de las células de la granulosa, que se refleja en una fase lútea de duración normal con bajas concentraciones de progesterona. Este mecanismo puede acontecer de forma ocasional no siendo una causa de infertilidad.

La causa periférica se debe a una alteración en el metabolismo ovárico de las prostaglandinas, no produciéndose isquemia apical en el folículo, y por tanto ausencia de ovulación. Las células de la granulosa sufren una luteinización adecuada dada la normalidad de la LH, por lo que las concentraciones de progesterona se incrementan aunque con niveles séricos inferiores en la mitad de la fase lútea con relación a las observadas en ciclos ovulatorios. Se conoce que el abuso de AINEs puede producirlo y su retirada puede ser el tratamiento más eficaz.

La introducción de la ecografía en el estudio de la reproducción humana constituye uno de los mayores avances en el estudio del síndrome. Del folículo luteinizado no roto, confirmándose el diagnóstico en el estudio combinado ecografía-determinación hormonal.

Aparecerán criterios indicativos de ausencia de ovulación como son la ausencia de líquido libre en Douglas (aunque este en ocasiones aparece por simple transudación) y la persistencia del folículo dominante tras 36 h del pico de LH, que en lugar de romperse aumenta de tamaño; además aparecen signos de luteinización, a saber: pared gruesa y dentada con ecorrefringencia en su interior.

Con el estudio doppler se observa la ausencia de la onda de conversión que caracteriza a la aparición del cuerpo lúteo.

Enfermedades que asocia LUF.-

1.- Endometriosis.- Basándonos en los estudios realizados hasta la actualidad podemos decir que parece existir una asociación causal entre la endometriosis y el síndrome del folículo luteinizado no roto en los casos más graves de la enfermedad, posiblemente como consecuencia de las adherencias.

2.- Síndromes adhesivos pélvicos.- Parece existir una relación entre ambos procesos de entorno a un 40 a un 80 %. La hipótesis más aceptada que explica el mecanismo por el cual las adherencias periováricas pueden inhibir la foliculogénesis son por una parte el factor mecánico y por otra la ooforitis subclínica (dicha hipótesis explica el empeoramiento del síndrome cuando se realizan técnicas de microcirugía). En los procesos pélvicos que cursan con adherencias se recomienda realizar laparoscopia y cirugía con adhesiotomía.

3.- Cirugía ovárica.- En estos casos actuaría una membrana fibrosa como factor mecánico

4.- Factores psicógenos.- Como la hiperprolactinemia por estrés, aunque existen pocos estudios al respecto.

VALORACIÓN CICLO ESTIMULADO PARA FIV

Los objetivos de la monitorización ecográfica de la respuesta ovárica a la estimulación en los ciclos de FIV son:

- * Determinar si la respuesta a las gonadotropinas es suficiente para la obtención de un número adecuado de oocitos maduros

- * Evitar el síndrome de hiperestimulación ovárica

- * Determinar el momento óptimo para inducir la maduración final de los oocitos.

El control ecográfico de los ciclos de FIV varía dependiendo de si se utilizan o no agonistas o antagonistas de la GnRH. Una vez se comienza la estimulación con gonadotropinas se recomienda una eco basal (figura 8).La siguiente la hacemos en nuestros protocolos a los 5 días de administración de gonadotropinas y a partir de ahí con la frecuencia que sea necesaria acorde al crecimiento folicular. En cada una de ellas se cuentan el número de folículos y se miden, contrastando la sincronía o asincronía en el crecimiento.

Cuando se obtengan 2-3 folículos con diámetro 16-18 mm, menos de 15 folículos y un grosor endometrial (7mm puede administrarse la hCG ese día y realizar la punción 36 horas después. Si los folículos tienen un tamaño menor debe calcularse un crecimiento de unos 2 mm/día. Los datos de 16-18 mm y 15 folículos son orientativos pero tienen un valor desde el punto de vista práctico.

a) Usando agonistas análogos de la GnRH: pauta larga, pauta corta, pauta ultracorta

Los agonistas sintéticos de la GnRH son unos decapeptidos caracterizados por primera vez en 1971 aunque se comenzaron a utilizar desde mediados de los años 80.

Tienen una gran afinidad por el receptor de la GnRH hipotalámico con una mayor vida media que la hormona endógena. Su efecto resulta en una estimulación inicial de las gonadotropinas (efecto flare up) seguida de una supresión de la liberación de las mismas que ocurre tras 14 días de administración continuada.

El objetivo de la administración de los agonistas de la GnRH es la supresión de la ovulación al prevenir el pico de secreción de la LH prematuro que podría producir una luteinización precoz de los folículos en desarrollo.

Existen preparados con diferente vía de administración: subcutánea o intramuscular depot, Triptorelina (Decapeptyl, Ipsen Pharma), Leuprorelina (Procrin, Abbott) e intranasal, Nafarelina (Synarel, Seid). La vía intranasal de absorción tiene una pequeña fluctuación inter e intra individual que en la mayoría de los casos resulta ser suficiente para prevenir elevaciones prematuras de los picos de LH.

La supresión hipofisaria por los agonistas de la GnRH se realiza de forma variable según el protocolo de administración (largo, corto o ultracorto).

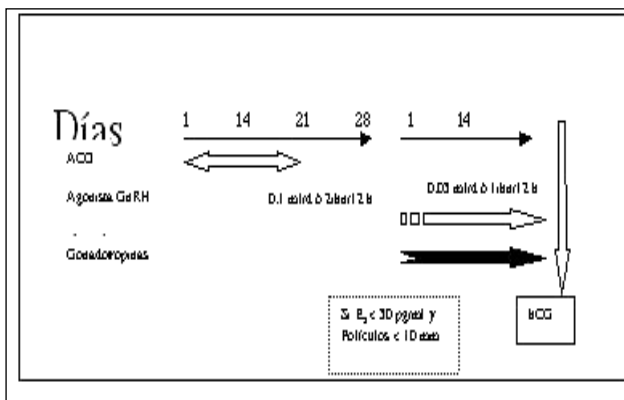
b) Protocolo largo de administración de análogos de GnRH

Se inicia en la fase lútea media (día 21 del ciclo). Se deben administrar al menos durante 14 días hasta que se produzca el freno hipofisario que se comprueba por la medida del estradiol plasmático ($E2 < 50$ pg/ml) y mediante la ETV (todos los folículos menores de 10 mm).(figura 12). La dosis administrada suele ser de 0.1 ml de acetato de leuprolide/día subcutáneo (Procrin, Abbott) o de 2 inhalaciones de nafarelina/12 horas (Synarel, Seid). Una vez se ha

producido el freno hipofisario comienza la fase de estimulación con gonadotropinas al tiempo que se disminuye la dosis de agonistas (0.05 ml de acetato de leuprolide/día subcutáneo ó 1 inhalación de nafarelina/12 horas) que se mantendrá durante el resto del ciclo hasta la administración de la hCG (5.000-10.000 UI) para inducir la ovulación tal y como se ha explicado antes.

Otros protocolos incluyen el doble freno hipofisario en los que administran anticonceptivos orales (ACO) desde el comienzo del ciclo anterior.

La pauta a seguir se resume en el Esquema 2:



Esquema 2

Esquema de la inducción-estimulación de la ovulación con gonadotropinas en la Fecundación in vitro usando agonistas GnRH en pauta larga con doble freno hipofisario.

c) Protocolo corto de administración de análogos de GnRH

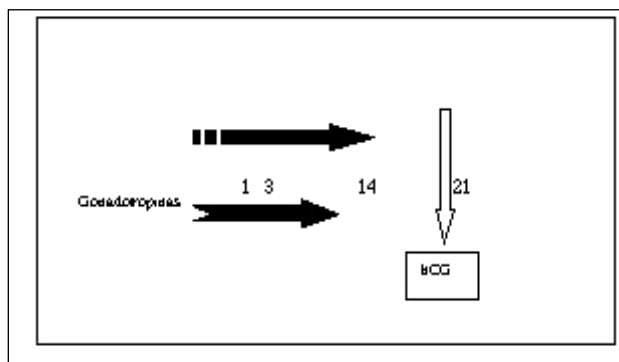
Consiste en la administración del agonista de GnRH desde el primer día del ciclo a la misma dosis hasta la aplicación de la hCG. De esta forma la hipófisis tendrá su función suprimida tras 5 días de administración y se aprovecha el efecto flare up de liberación de gonadotropinas endógenas que se suma al efecto de las exógenas y se disminuye el excesivo freno ovárico.

Se comienza con la administración de gonadotropinas el día 2-3 del ciclo hasta la obtención de los folículos preovulatorios. La asincronía es más frecuente con este protocolo que con el anterior de tal forma que la calidad oocitaria es muy desigual.

En un esquema el protocolo de administración sería (Esquema 3):

d) Usando antagonistas de la GnRH

Los antagonistas de la GnRH (GnRHa) son molé-



Esquema 3

Esquema de la inducción-estimulación de la ovulación con gonadotropinas en la Fecundación in vitro usando agonistas GnRH en pauta corta

culas originadas tras la sustitución de determinados aminoácidos en la molécula nativa de GnRH. Son inhibidores competitivos específicos de los receptores de la GnRH lo que produce una rápida disminución de las gonadotropinas hipofisarias (LH en primer lugar y posteriormente FSH) seguida de una rápida fase de recuperación (entre 3 y 4 días) tras su retirada. Ello permite un control más fino del ciclo hormonal en los programas de Reproducción Asistida.

Desde el primer compuesto sintetizado en 1972, han sido varios los intentos de reducir su principal efecto secundario, la liberación de histamina, hasta conseguir en la actualidad dos compuestos con escasos efectos nocivos como son el Cetorelix (Cetrotide; Asta Medica) y Ganirelix (Orgalutran; Organon). Otros compuestos como el Antide (Serono), Antarelix o Azaline-B, se encuentran aún en fases más precoces de investigación.

PROTOCOLOS DE ADMINISTRACIÓN

El objetivo principal de su administración, al igual que para los antagonistas de la GnRH, se basa en la prevención de una elevación prematura de la LH. Para ello se han diseñado dos protocolos de administración del cetorelix según sea dosis única o múltiple.

- Dosis única:

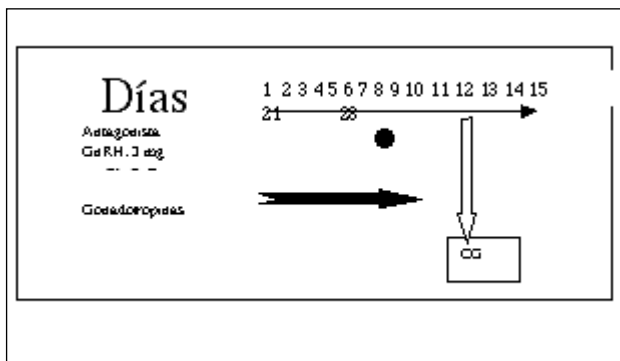
se comienza con estimulación con gonadotropinas desde el día 3 del ciclo. Inicialmente se prescindió de la ecografía recomendándose una única dosis de Cetorelix el día 8 ciclo. Actualmente la administración se basa también en la ecografía como veremos

más adelante. La dosis mínima eficaz sugerida es de 3 mg de cetrorelix.

En bajas respondedoras puede ser necesario repetir la dosis cada 3-4 días hasta la administración de la hCG.

Algunos autores sostienen que la administración en dosis única se asocia a una menor duración del tratamiento con gonadotropinas a costa de obtener un menor número de embriones.

En un esquema el modo de administración con dosis única sería (Esquema 5):



Esquema 5

Esquema de la inducción-estimulación de la ovulación con gonadotropinas en la Fecundación in vitro usando antagonistas de la GnRH en dosis única.

*** Dosis múltiple :**

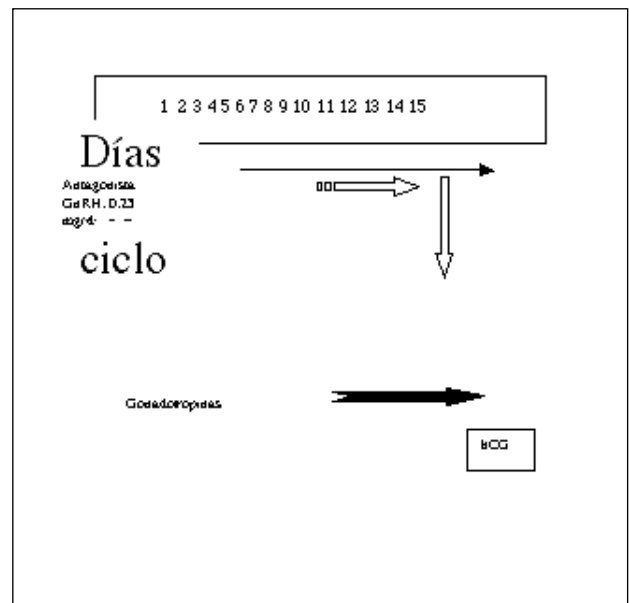
Del mismo modo se comienza con estimulación con gonadotropinas exógenas desde el día 3 del ciclo. Se administran pequeñas dosis de Cetrorelix en combinación con gonadotropinas exógenas (FSH) desde el día 6-7 de estimulación (cuando se alcancen folículos de 13-14 mm). En este caso la dosis mínima eficaz sugerida es de 0.25 mg tanto con ganirelix como con cetrorelix.

A modo de esquema, la pauta a seguir con dosis múltiple sería (Esquema 6):

INDICACIONES DE USO

Entre los casos en los que resulta beneficiosa la utilización de los antagonistas de la GnRH destacan:

- * Mujeres con factores de riesgo a desarrollar un Síndrome de Hiperestimulación Ovárica (SHO)
- * Para reducir la actividad de los cuerpos lúteos al administrarlo durante la fase lútea
- * Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP) con valores elevados de LH y del cociente LH/FSH



Esquema 6

Esquema de la inducción-estimulación de la ovulación con gonadotropinas en la Fecundación in vitro usando antagonistas de la GnRH en dosis múltiple

*** Mujeres bajas respondedoras**

En mujeres con SOP, el efecto nocivo atribuido al exceso de LH parece depender más de la presencia de hiperinsulinismo que de la adición de LH al protocolo de estimulación, dada la escasa vida media de la LH exógena.

MONITORIZACIÓN DEL CICLO

La monitorización suele comenzar tras 5 días de estimulación con periodicidad de 48 horas hasta la obtención de un folículo entre 1.2-14mm que será el día de la administración del antagonista (para dosis única) o el primer día de administración (para dosis múltiples). Es importante tener en cuenta este aspecto del tamaño folicular (Tabla 5).

Posteriormente se harán controles hasta la administración de hCG según la pauta habitual.

Hay que tener en cuenta que la administración de la hCG se recomienda que se realice antes de las siguientes 24 horas de la última administración del antagonista.

COMBINACIÓN CON OTROS PROTOCOLOS

Debido a su rápida supresión del pico de LH, los

Tabla 5

Importancia del tamaño folicular en la administración de los antagonistas de la GnRH

El día de la administración del antagonista de la GnRH no debe ser antes de que exista al menos un folículo >12-14 mm debido a que podría interferir con el desarrollo folicular y la producción de estradiol. Además es bastante improbable que aparezca un pico de LH antes de dicho tamaño folicular.

antagonistas de la GnRH también tienen su aplicación en pacientes poco respondedoras o con ovarios poliquísticos, al administrarse junto con citrato de clomifeno y gonadotropinas.

También se está estudiando su uso en ciclos naturales y en ciclos de IAH durante la fase folicular tardía, con lo que se consigue una menor tasa de cancelación de ciclos por la prevención de la luteinización precoz folicular

1. Casos especiales de inducción-estimulación de la ovulación

El objetivo principal en estos casos será la restauración lo más fisiológica posible de la función ovárica.

PACIENTES CON SOP ANOVULADORAS (GRUPO II OMS)

En estas pacientes la FSH presenta unos niveles normales mientras que la LH resulta estar elevada. Tanto si se induce la ovulación con HMG o con FSH, ocurre la ovulación, con un número equivalente de gestaciones. Sin embargo el uso de FSH tiene asociado una menor tasa de SHO. Según diversos autores la FSH recombinante es más efectiva que la FSH urinaria (tanto FSH purificada como FSH altamente purificada) al inducir el desarrollo folicular, necesitarse una menor dosis total y una menor duración de tratamiento.

Existen diferentes protocolos de administración según se comience con estimulación con bajas dosis que van incrementándose progresivamente hasta conseguir la ovulación (protocolo step-up o low dose step-up) o comenzar con una mayor dosis que posteriormente se va disminuyendo (protocolo step-down).

La posibilidad de ir aumentando progresivamente la dosis de FSH estimulante (protocolo step-up) resulta más segura dada la alta sensibilidad de los ovarios poliquísticos a las gonadotropinas exógenas y la

posibilidad de producirse una hiperestimulación ovárica. Podría ser el protocolo de elección en este tipo de ovarios. En el protocolo de low dose step-up la dosis administrada inicialmente puede ser muy pequeña, ajustándola individualmente. Balasch et al proponen la administración de dosis iniciales de 37.5 UI de FSHr en pacientes con SOP subiéndola a la semana si no hay respuesta. La media de tratamiento fue de 13 días. En este sentido, el Estudio IO-50 es el primer estudio observacional, prospectivo, multicéntrico realizado en España con FSH recombinante (fitotropina beta), que demuestra la eficacia y seguridad de una pauta de baja dosis (50 UI de FSH recombinante) en inducción de la ovulación. El estudio se llevó a cabo con 456 pacientes con esterilidad anovulatoria (grupo II de la OMS). La dosis media diaria requerida para obtener 1 a 3 folículos (16 mm fue de 50 UI con una duración media entre 9 y 14 días de tratamiento. La ecografía es la forma de monitorizar el tratamiento. Se consiguió inducir la ovulación en el 84% de las pacientes evaluadas y se obtuvo una tasa de gestación acumulada del 48% en los primeros 4 ciclos de tratamiento y del 53% a los 6 ciclos. En lo que respecta a la seguridad de la pauta, en todos los ciclos evaluados la incidencia del SHO fue pequeña no observándose ningún caso grave. El riesgo de embarazo gemelar fue bajo (no se notificaron embarazos múltiples de orden superior), y la tolerabilidad a nivel local y sistémico fueron aceptables.

Con este estudio se demuestra la eficacia, seguridad y tolerabilidad de esta pauta de estimulación de la ovulación con dosis bajas de FSHr en pacientes anovuladoras.

El coste de la hormona FSHr por unidad, sigue siendo alto y es de esperar que en un futuro descienda con lo que el paso habrá sido importante.

La ecografía, es también la piedra angular en la que nos apoyamos las modernas unidades de reproducción para la aplicación de las distintas técnicas, ya que nos ayuda a valorar las dosis inicial de gonadotropinas, y la respuesta a estas, de modo que ovarios con un tamaño inferior a 3 cc, y menos de 5 folículos antrales tendrían peor respuesta y mayor tasa de cancelación (1,2,3), lo cual es importante, ya que nuestro grupo a encontrado un porcentaje mayor de embarazos por ciclo en pacientes con alta respuesta (34). La medida de los folículos también es importante, ya que hay estudios que demuestran que por debajo de 14 mm, el índice de fertilización es menor (35). Por otra parte, la ecografía, nos indica cual es el ovario destinado a ovular, el momento en que debemos administrar la HCG previa la Inseminación artificial o la punción en Fecundación In Vitro. También la eco-

grafía nos aporta datos sobre la situación hormonal, existiendo múltiples trabajos que relacionan el tamaño de los folículos y el estradiol.

Recientemente se han publicado trabajos utilizando power Doppler, en el que se registró la vascularización de los folículos de forma individual utilizando un sistema de puntuación de acuerdo a la proporción de la circunferencia del folículo que mostraba vascularización. Grado 1 con menos de un cuarto de folículo vascularizado sería el más pobre y grado 4 con más de 3/4 de la circunferencia del folículo irrigada sería el mejor. Se encontró una mayor proporción de oocitos de buena calidad en los folículos mejor irrigados con mejor calidad embrionaria. Otro dato interesante fue que se encontró una asociación significativa entre grado de vascularización pobre y la incidencia de embriones triploides.

Si comparamos ciclos naturales con ciclos estimulados con clomifeno o gonadotrofinas, se puede observar que en general el flujo sanguíneo es más alto, y más fácilmente registrable de forma precoz en ciclos estimulados. Esto es más marcado cuanto mayor es el grado de respuesta del ovario. Por el contrario, los cambios de una fase a otra del ciclo son menos marcados, debido como ya hemos dicho a que el flujo se incrementa de forma más precoz, y tiende a ser más uniforme durante todo el ciclo. No obstante, también se puede constatar un aumento de este a lo largo del ciclo. Algunos autores (41), han demostrado que es posible mejorar el flujo sanguíneo a nivel uterino y ovárico por medio de la administración exógena de estrógenos y progesterona.

Desde el punto de vista de la exploración con Doppler, el cuerpo lúteo se caracteriza por un aumento de la neoangiogénesis, que tiene como resultado la formación de una red vascular que lo rodea (anillo de fuego), este anillo es más acentuado si exploramos con power Doppler. El cuerpo lúteo llega a recibir hasta un 90% del flujo del ovario en fase lútea media.

A partir de la ovulación, se produce un incremento de flujo, que produce un aumento de la intensidad de recepción, con un registro más fácil de la OVF y un mapa color más rico. En el sonograma, la superposición de ondas y la dispersión de frecuencias, es causada por un aumento de la turbulencia del flujo, que es originado por la neoangiogénesis, la formación de anastomosis y la pérdida de la forma helicoidal de las arterias espirales, que son distendidas al aumentar el tamaño del ovario, ocasionando una pérdida de la estabilidad hemodinámica. Todo ello, lleva a una dispersión de frecuencias que origina una pérdida de la nitidez en el perfil de la onda. Por último, si existía, desaparece la incisura entre sístole y diástole. A este conjunto de cambios, L. Merce

lo denominó como Onda de conversión lútea. Las características de la onda de conversión se mantienen durante toda la fase lútea. En ciclos con fase lútea deficiente Merce y col, encontraron signos de conversión lútea, pero no los encontraron en ciclos con anovulación. Se pueden apreciar signos de conversión lútea en los momentos que anteceden a la ovulación con desarrollo folicular múltiple, lo que es frecuente en ciclos hiperestimulados.

Ha sido propuesto que la angiogénesis en el cuerpo lúteo es necesaria para el metabolismo de las proteínas de baja densidad y la regulación en la producción de progesterona. Por ello una vascularización inadecuada del Cl, ha sido implicada como marcador de un defecto de fase lútea. Glock y col, demostraron una correlación positiva entre los niveles de progesterona y el IR en el CL en ciclos naturales. En ciclos estimulados la relación entre los IR y los niveles de progesterona son mucho menos consistentes. Hemos podido observar, al igual que otros autores una mayor impedancia en el circuito intraovárico en los ciclos con insuficiencia lútea. En los ciclos ovulatorios los IR no superaban 0.47(rango 0.35-0.47), y en ciclos con fase lútea deficiente el IR era superior a 0.50. Aunque la LH no participe directamente en este proceso, parece que lo hace por medio de las prostaglandinas, potentes vasodilatadores, cuya presencia parece esencial para la transformación lútea. Como podemos comprobar, los últimos estudios para determinar una posible insuficiencia del cuerpo lúteo, están basados en estudios fluxométricos con Doppler. Serían de mal pronóstico los cuerpos lúteos con índices de resistencia mayores de 0.55, y escaso mapa color en fase mesolútea, lo que indicaría una pobre vascularización, que se acompaña de una secreción esteroidea insuficiente.

Kupesic , Kurjak y col , encuentran una relación estadísticamente significativa entre la perfusión uterina y ovárica con marcadores hormonales e histológicos de receptividad uterina, alcanzando una máxima sensibilidad en el flujo intrauterino e intraovárico. Surge pues, un nuevo método para evaluar la función lútea, que hoy día tiene aún gran incidencia de falsos positivos y negativos debido a la falta de reproducibilidad de los distintos valores propuestos, y a la variabilidad interobservador. Son necesarios la realización de trabajos prospectivos y randomizados, y un método más objetivo para el análisis de las OVF. No obstante, pensamos, que actualmente es preciso la valoración morfológica y fluxométrica del cuerpo lúteo, que complementada con las determinaciones de progesterona plasmática nos dará una información más veraz y precisa de la funcionalidad de esta importante

glándula, que tiene como función la preparación secretora del endometrio, para aumentar su receptividad a la implantación embrionaria.

El Doppler a nivel intraovárico, también resulta ser de utilidad en los programas de reproducción asistida. Así, Nargund y col, encontraron una relación positiva entre el porcentaje de recuperación y la presencia o ausencia de color perifolicular. El pico sistólico máximo era más alto en aquellos folículos que dan embriones de buena calidad morfológica, concluyendo su estudio afirmando que el valor del pico sistólico determinado antes de la HCG, puede ser empleado para identificar los folículos con alta probabilidad de dar lugar a embriones preimplantatorios de buena calidad. Resultados similares encuentra Oseyansa . Chui (51), va un poco más lejos, y aunque no encuentra diferencias estadísticas entre el grado de vascularización y los porcentajes de fertilización, si encuentra diferencias en el porcentaje de implantación, de manera que el grado de vascularización, sería un marcador de la capacidad de implantación embrionaria. Otros estudios como el realizado por Bassil (52), encuentran que con $IR > 0.56$ el número de ovocitos obtenidos es menor, y mayor la duración de la estimulación. Aunque algunos autores no encuentran correlación entre los IR e IP con el riesgo de HPO (53), otros como Moohan y col (54), encuentran que en pacientes con hiperrespuesta a gonadotrofinas, el riesgo de hiperestimulación aumenta, si el IR es inferior a 0.48 y el IP inferior 0.75. Esto parece indicar un mayor riesgo de HPO en pacientes con ovarios más vascularizados.

Muy recientemente se ha escrito sobre el papel de la tensión de oxígeno en la salud del ovocito. El Grupo de Blerkom, (55, 56) en Colorado, ha observado una gran variación en la PO₂ de los líquidos foliculares estudiados, sugiriendo que algunos folículos estarían pobremente vascularizados, o con problemas en el transporte de oxígeno a través de la pared folicular. Los ovocitos de provinientes de folículos hipóxicos se asociaron con una alta frecuencia de alteraciones en la organización de los cromosomas en el uso acrosómico de la metafase, lo que daría origen a problemas en la segregación de los cromosomas y a graves problemas de mosaicismo en los estadios embrionarios tempranos. Así pues, la irrigación perifolicular parece jugar un papel esencial en la regulación de la tensión de oxígeno intrafolicular.

Como vemos por estos estudios, también el Doppler y la ecografía aportan datos, que sin duda son de gran utilidad para mejorar y predecir los resultados cuando empleamos técnicas de reproducción asistida. De estos estudios se deduce que el clí-

nico debe prestar mucha más atención a los detalles de la angiogénesis perifolicular, si quiere obtener ovocitos sanos.

2. Valoración del ciclo endometrial

Durante la fase menstrual inicial, el endometrio permanece hiperecogénico al igual que en la fase lútea, pero poco a poco aparecen áreas anecoicas en el interior, que representan sangre. Las zonas ecogénicas son debidas a endometrio desprendido y a detritos retenidos en la cavidad uterina. Un refuerzo posterior, propio también de la fase lútea puede mantenerse, aunque habitualmente de menor intensidad. Poco a poco las áreas anecoicas se hacen coalescentes, y se entremezclan con zonas hiperecogénicas que representan restos endometriales. Se puede visualizar con Power doppler la salida de sangre por el cérvix. Cuando la mayoría del endometrio se ha desprendido y expulsado, se visualiza como un área anecoica (sangre), rodeada de una capa fina hiperecogénica que representa la unión endometrio-miometrial y la capa funcional del endometrio.

Una vez descamado el endometrio, éste se ve como una delgada línea hiperecoica de 1 a 3 mm, en ocasiones con sangre residual. Sin embargo, la mayoría de las veces aparece como una sola línea ecogénica, que representa la cavidad uterina. En ocasiones, se puede ver un halo hipoecoico rodeando el endometrio, que se atribuye a una capa de vascularización entre el miometrio y el endometrio.

Muy pronto las líneas hiperecogénicas que representan la unión endometrio-miometrial se hacen patentes, y el endometrio comienza a ofrecer el típico aspecto de triple línea. El desarrollo de las líneas hiperecogénicas de la unión endometriometrial, en general, no se realiza simultáneamente, sino que comienza a aparecer en algunas zonas que pronto convergen y se hacen prominentes, rodeando la totalidad del endometrio.

El endometrio que hemos dado en denominar como de triple línea, está formado por dos líneas externas hiperecogénicas, que representan la unión entre el endometrio basal y el miometrio, dos bandas hipoecoicas, que representan la capa funcional esponjosa del endometrio, con sus glándulas y vasos, y por una línea central hiperecogénica, que representa la luz de la cavidad, que es ecogénica debido a que el endometrio está tapizado por mucosidad, y por la capa compacta del endometrio, originándose una interfase que refleja los ultrasonidos. Puede apreciarse también en esta fase el halo hipoecogénico ya citado que rodea el endometrio, de aproximadamente 2 mm, justo por el

exterior de las dos líneas hiperecogénicas de la unión endometriometrial.

Conforme avanza la fase folicular, el endometrio se va haciendo progresivamente más grueso, creciendo a razón de 0,5 mm de media diario, llegando habitualmente a alcanzar de 9 a 14 mm. Todo el crecimiento lo hace a partir de la esponjosa, es decir, de la capa intermedia sonoluscente, por lo que podríamos decir que una vez puesto el pilar (la basal ecorrefringente) y el techo (la compacta eco refringente) el edificio crece mediante los pisos (la esponjosa sonoluscente).

Las líneas exteriores se hacen más prominentes y ecogénicas, especialmente en los momentos que preceden a la ovulación, debido probablemente al aumento en los niveles plasmáticos de progesterona que se produce tras el pico preovulatorio de LH.

A menudo puede verse líquido en la cavidad endometrial durante la fase periovulatoria. Este líquido no es secundario a la secreción de las glándulas endometriales, que no aparecen hasta ya iniciada la fase lútea. Lo más probable, es que el moco cervical sea aspirado por contracciones miometriales hasta la cavidad. El moco es muy abundante en esta fase como consecuencia del alto nivel de estrógenos circulantes. Las contracciones miometriales, por lo general, progresan desde el cuello hasta el fondo uterino en la fase folicular tardía, y son de una intensidad mayor en los momentos que preceden a la ovulación. Estas contracciones uterinas las hemos podido observar y grabar personalmente en los ciclos que monitorizamos. Para ello tan solo es preciso tener paciencia, y mantener la sonda en posición durante unos minutos, aunque no siempre este esfuerzo se verá recompensado, ya que se producen de manera aislada y arrítmica. Son especialmente frecuentes cuando introducimos sondas en el curso, por ejemplo, de las inseminaciones intrauterinas, ya que se producen consecuencia de un estímulo mecánico, como es el contacto de la cánula con el endometrio. También son más frecuentes en los ciclos estimulados por los altos niveles estrogénicos. Estas contracciones parecen importantes ya que están relacionadas con el ascenso rápido de espermatozoides a la cavidad uterina y a las trompas. Como contrapartida negativa, diremos que pueden causar reflujo en las inseminaciones intrauterinas, y en los ciclos de FIV pueden causar la expulsión de los embriones hacia la vagina, o bien hacia las trompas, siendo la causa de los embarazos ectópicos en mujeres con patología tubárica. El líquido en cavidad resulta, pues, un factor de mal pronóstico.

Tras la fase folicular sucede la lútea, que también tiene su traducción ecográfica. En los primeros mo-

mentos después de la ovulación, el engrosamiento de las dos líneas externas hiperecogénicas se hace muy notorio. Este engrosamiento de la capa basal a veces es anterior a la ovulación y es debido al aumento de progesterona que precede a la ovulación, y cabe pues ser interpretado como signo de ovulación inminente, aunque cuando se observa de manera muy precoz podría indicar la existencia de picos de LH y luteinización precoz.

El crecimiento en grosor del endometrio se retarda, apreciándose en los primeros días postovulatorios incluso una disminución inconstante de 1 a 2 mm. En los días de fase lútea media se alcanza el grosor máximo del endometrio, que suele ser 1 a 3 mm mayor que el endometrio en fase folicular preovulatoria, alcanzándose una meseta en el crecimiento unos 5-6 días tras el pico de LH. Las bandas anecoicas que representan el endometrio funcional, se comienzan a llenar de zonas ecogénicas irregulares, hasta hacerse totalmente hiperecogénicas. Este proceso es siempre centrípeto, es decir, se efectúa del exterior hacia el interior. En los 4 a 6 primeros días de fase lútea se puede apreciar, aunque con menor nitidez, la línea ecogénica de la cavidad endometrial. La transformación del endometrio funcional de hipoecogénico a hiperecogénico suele estar completo a los 7-8 días de fase lútea, y así el endometrio triple línea se ha ido transformando, poco a poco, en un endometrio completa y uniformemente hiperecogénico, al que progresivamente acompaña un leve refuerzo posterior, dando el aspecto clásico del endometrio secretor avanzado. Siete días después de la ovulación, en el periodo propicio para la implantación, es frecuente ver una halo hipoecogénico que rodea al endometrio, y que se corresponde con irrigación edema de la basal.

En los días que preceden a la menstruación, pequeñas áreas hipoecogénicas van apareciendo. Estas áreas probablemente representan hemorragias y zonas de degeneración del endometrio, que son un preludio del inminente inicio menstrual. Estas zonas pueden comenzar a apreciarse varios días antes del sangrado menstrual.

3. Captación de oocitos

Después de una época en que la obtención de oocitos se hacía por laparoscopia, la punción transabdominal, guiada por ultrasonidos, vino a desplazarla parcialmente y la punción transvaginal totalmente, de forma y manera que es hoy la forma más sencilla segura y rápida de obtener oocitos y la utilizada por prácticamente todos los grupos del mundo.

Nosotros la adaptamos en 1988, y desde entonces

hemos realizado 9325 punciones sin haber tenido que realizar no una sola laparotomía por hemorragia y con un índice de complicaciones muy bajo (0,65%) aún incluyendo enfermedad inflamatoria pélvicas, y cuadros adherenciales tardíos, que pudieran atribuírsele a la técnica. Aunque han sido descritos no hemos tenido en nuestra casuística ningún caso de lesión ureteral. No es aquí el lugar para hacer una descripción exhaustiva del procedimiento, pero es evidente que gracias a él los ginecólogos hemos sido capaces de poner sobre la placa de los biólogos un número considerablemente mayor de oocitos que con la laparoscopia y de una forma mucho más fácil y repetible.

4. Ayuda a la transferencia embrionaria en fertilización in vitro.

Recientemente varios trabajos apoyan la idea que la transferencia guiada por ultrasonidos, evitando la estimulación del fundus uterino, induciría menos contracciones miométriales y provocaría una menor tasa de expulsiones embrionarias y por ende mayor de implantaciones y embarazos. Si estos trabajos se confirman habría que incorporar la ecografía de forma rutinaria también a la transferencia.

5. Confirmación de la gestación y desarrollo inicial

Evidentemente la ecografía es también el método confirmatorio de la gestación intrauterina tras la BHCG positiva y permite identificar el saco gestacional a los dos pocos días de retraso. Con los nuevos equipos el power doppler ya avisa de que el endometrio está bien irrigado y no se va a descamar y tan pronto como dos días de amenorrea puede identificarse un anillo sonoluscente pequeño que corresponde al saco gestacional. Luego pueden identificarse vesícula vitelina, y desarrollo embrionario, pero no es este el lugar para una descripción detallada del proceso.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Albano C, Felberbaum R, Smitz J.** On behalf of the European Cetorelix Study Group. Ovarian stimulation with HMG: results of a prospective randomized phase III European study comparing the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-antagonist cetorelix and the LHRH-agonist buserelin. *Hum Reprod* 2000; 3:526-31
2. **Al-Shawaf T, Zosmer A, Hussain S, Tozer A, Panay N, Wilson C, Lower AM, Grudzinskas JG.** Prevention of severe ovarian hyperstimulation syndrome in IVF with or without ICSI and embryo transfer: a modified 'coasting' strategy based on ultrasound fo-roidentification of high-risk patients. *Hum Reprod* 2001;16(1):24-30
3. **Andreani CL, Diotallevi L, Lazzarin N, Pierro E, Gianinni P, Lanzone A, Capitanio P, Mancuso S:** The cellular activity of different sized follicles in cycles treated with gonadotrophin-releasing hormone analogue. *Hum Reprod* 12:1, 89-94 (1997).
4. **Bajo JM, Aguirre JF, Romo A, Garcia-Frutos A:** Ultrasonografía de la patología funcional ovárica. Papel de la punción aspiración con aguja fina. En *Ultrasonografía y reproducción*. JM Bajo Arenas. Ed JR Prous. S.A,1996
5. **Bassil S, Wyns C, Toussaint-Demille D, Nisolle M, Gordts S, Donnez J:** The relationship between ovarian vascularity and the duration of stimulation in-in vitro fertilization. *Hu, Reprod* 12:6, 1240-1245 (1997).
6. **Balasz J, Fabregues F, Creus M, Casamitjana R, Puerto B, Vanrell, J.** Recombinant human follicle-stimulating hormone for ovulation induction in polycystic ovary syndrome: a prospective, randomised trial of two starting doses in chronic
7. **Borm G, Mannaerts B.** Treatment with the gonadotrophin-releasing hormone antagonist ganirelix in women undergoing ovarian stimulation with recombinant follicle stimulating hormone is effective, safe and convenient: results of a controlled, randomized, multi-centre trial. The European Orgalutran Study Group. *Hum Reprod.* 2000;15(7):1490-8
8. **Bourne TH, Hagstrom HG, Hahlin M, Josefsson B, granberg S, Hellberg P, Hamberger L, Collin W:** Ultrasound studies of vascular and morphological changes in the human corpus uteum during the menstrual cycle. *Fertil Steril* 65:4, 753-758 (1996).
9. **Brown SE, Coddington CC; Schnorr J, Toner JP, Gibbons W, Oehninger S.** Evaluation of outpatient hysteroscopy, saline infusion hysterosonography, and hysterosalpingography in infertile women: a prospective, randomized study. *Fertil Steril* 2000;74:1029-34
10. **Dubey AK, Wang HA, Duffy P, Penzias AS:** The correlation between follicular measurements, oocyte morphology, and fertilization rates in an in-vitro fertilization program. *Fertil Steril* 64:4, 787-790 (1995)
11. **Forman R, Egan D, Robinson J, Reynolds K, Yudking P, Barlow DH.** What the true follicular diameter: and assessment of the reproducibility of transvaginal ultrasound monitoring in stimulated cycles. *Fertil Steril.* 1991; 56, 5: 989-992.
12. **Garrido A, Martinez-Perez O, Ponce S Uguet C, Huertas M, Moreno F, Bajo J.** Signos Ultrasonograficos de EIP grave. *Prog Diag Prenat.* 2000;12(3):58-63

13. **Glock JL, Brumsted JR:** Color flow pulsed Doppler ultrasound in diagnosing luteal phase defect. *Fertil. Steril* 64: 500-504
14. **Hackeloer BJ, Fleming R, Robinson HP, et al:** Correlation of ultrasonic and endocrinologic assessment of human follicular development. *Am J Obstet Gynecol* 135: 122. 1979
15. **Hamilton CJCM, Evers JLH, Tan FES, Hoogland HJ:** The reliability of ovulation prediction by a single ultrasonographic follicle measurement. *Hum Reprod* 2:103, 1987
16. **Hanna MD, Chizen DR, Pierson AR:** Characteristics of follicular evacuation during human ovulation. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 488-493. 1994
17. **Hilgers TW, Dvorak AD, Tamisea DF, et al:** Sonographic definition of empty follicle syndrome. *J Ultrasound Med* 8: 411, 1987
18. **Hughes E, Collins J, Vandekerckhove P** Ovulation induction with urinary follicle stimulating hormone versus human menopausal gonadotropin for clomiphe-ne-resistant polycystic ovary syndrome *Cochrane Database Syst Rev* 2000;(2):CD000087
19. **Kupescic S, Kurjak A, Vujisić S, Petrovic Z:** Luteal phase defect: comparison between Doppler velocimetry, histological and hormonal markers. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 9 (1997) 105-112
20. **Kurjak A, Kupescic S, Jacobs I.** Preoperative diagnosis of the primary fallopian tube carcinoma by three-dimensional static and power Doppler sonography. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2000 Mar;15(3):246-5
21. **Kurjak A, Kupescic U, Schulman H, Zalud I.** Transvaginal color Doppler in assessment of ovarian and uterine blood flow in infertile women. (1991) *Fertil Steril.* 168: 870-873
22. **Lass A, Skull J, McVeigh E, Margara R, Winston ML:** Measurement of ovarian volume by transvaginal sonography before ovulation induction with human menopausal gonadotropin for in-vitro fertilization can predict poor response. *Hum Reprod* 12:2, 294-297 (1997).
23. **Lunenfeld E, Schaeartz I, Meizner I, Potashnik G, Glezerman M:** Intraovarian blood flow during spontaneous and stimulated cycles. *Hum Reprod* 11: 2481-2483 (1996).
24. **Merce LT, Garcés MJ, Barco JM, De la Fuente F:** Intraovarian Doppler velocimetry in ovulatory, dysovulatory and anovulatory cycles. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2 (1992) 197-202
25. **Mercé LT.** Velocimetría Doppler durante el ciclo ovárico normal. Em Mercé LT. (Ed.). *Ecografía Doppler en obstetricia y ginecología.* Interamericana McGraw-Hill, Madrid 1993;113-128
26. **Mercé LT:** Ecografía Doppler de la disfunción ovárica: En *Ecografía Doppler en obstetricia y ginecología.* Ed Interamericana-McGraw-Hill.(1995).
27. **Metha E, Matwijiw E, Lyons E, Faiman C.** Non invasive diagnosis of resistant ovary syndrome by ultrasonography. *Fertility and sterility* 1992. 57: 56-61.
28. **Nargund G, Doyle PE, Bourne TH, Parson JH, Cheng VC, Campbell S, Collins VP:** Ultrasound derives indices of follicular blood flow before HCG administration and the prediction of oocyte recovery and preimplantation embryo quality. *Hum Reprod* 11:11, 2512-2517 (1996)
29. **Ng EH, Ho PC J.** Use of gonadotrophin releasing hormone (GnRH) antagonist (cetrotide) during ovarian stimulation for in-vitro fertilization treatment: multiple doses and single dose. *Obstet Gynaecol Res* 2001;27(5):261-5..
30. **Olivennes F, Belaisch-Allart J, Emperaire J-C, et al.** Prospective randomized controlled study of in vitro fertilization-embryo transfer with a single dose of a luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH); antagonist (cetorelix) or a depot formula of an I.H-RH agonist (triptorelin). *Fertil Steril* 2000; 73:314-20
31. **Oyesanya OA, Parsons JH, Collin WP, Campbell S:** Intrafollicular hemodynamics before the administration of human chorionic gonadotropin in women at risk of the ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 65:4, 874-876 (1996)
32. **Oyesanya OA, Parsons JH, Collin WP, Campbell S:** Prediction of oocyte recovery rate by transvaginal ultrasonography and color Doppler imaging before human chorionic gonadotropin administration in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 65:4, 806-809 (1996).
33. **Pérez-Medina T, Bajo J, Huertas MA, Rubio A.** Predicting atypia inside endometrial polyps. *J Ultrasound Med* 2002;21:125-8
34. **Pérez-Medina T, Bajo JM, Martínez-Cortés L, Castellanos P, Pérez de Ávila I.** 6000 office diagnostic-operative hysteroscopies. *Int J Gynecol Obstet* 2000;71:33-8
35. **Perez-Medina T, Huertas MA, Bajo JM,** Early ultrasound-guided transvaginal drainage of tuboovarian abscess: A randomized study. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1996 7: 435-438
36. **Pérez-Medina T, Huertas MA, Rojo J, Martínez-Cortés L, Uguet de Resayre C, Pérez Medina A, Bajo J.** Ultrasonografía transvaginal en el diagnóstico de los pólipos endometriales. *Clin Invest Gin Obst* 1995;22:131
37. **Pérez-Medina T, Martínez O, Folgueira G, Bajo JM.** Which endometrial polyps should be resected? *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 1999;6:71-4
38. **R. Ron-El, A. Raziel, M. Schachter.** Induction of ovulation with antagonists of GnRH. *Hum Reprod Update* 2000; 6: 318-321.

39. **Schats, P. De Sutter, JAM.** Kremer Ovaarian stimulation in IVF treatment: comparison of human recombinant FSH with urine highly purified. *Hum Reprod* 2000; 15: 1691-97
40. **Strigini F, Scida P, Parri C, Visconti A, Susini S, Genazzani A:** Modifications in uterine and intraovarian artery impedance in cycles of treatment with exogenous gonadotrophins: effects of luteal phase support. *Fertil Steril* 64:1, 76-80 (1995).
41. **Syrop CH, Willhoite BA, Van Voorhis BJ:** Ovarian volume: a novel outcome predictor for assisted reproduction. *Fertil Steril* 64:6, 1167-1171 (1995).
42. **Timor - Tritsch I. E., Lerner J. P., Monteagudo A., Murphy K. E., Heller D. S.** Transvaginal sonographic markers of tubal inflammatory disease. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1998; 12: 56-66.
43. **Timor - Tritsch I. E., Rottem S.** Transvaginal ultrasonographic study of the Fallopian tube. *Obstet Gynecol* 1987; 70: 424-28.
44. **Tomas C, Nuojuu-Huttunen S, Martikainen H:** Pretreatment transvaginal ultrasound examinations predicts ovarian responsiveness to gonadotrophin in in-vitro fertilization. *Hum Repro* 12:2, 220-223 (1997)
45. **Van Blerkom J, Antczak M, Schrader R.** The developmental potential of the human oocyte is related to the oxygen content of follicular fluid-association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Hum Reprod* 1997; 12: 1047-1055
46. **Van Blerkom J.** Epigenetic influences in oocyte developmental competence-perifollicular vascularity and intrafollicular oxygen. *Journal of Assisted Reproduction & Genetics* 1998; 12:1047-1055
47. **Weiner Z, Thaler I, Levron J, Lewit N, Itskovitz-Eldor J.** (1993). Assessment of ovarian uterine blood flow by transvaginal color Doppler in ovarian-stimulated women: Correlation with the number of follicles and steroid hormone levels. *Fertil. Steril.* 59:743-749
48. **Yarali H, Gurgan T, Erden A, Kisanisci HA.** Colour Doppler hysterosalpingosonography: a simple and potentially useful method to evaluate fallopian tubal patency. *Hum Reprod.* 1994 Jan;9(1):64-6.
49. **Zaidi J, Jurkovic S, Campbell S, Okokon E, Tan SL:** Circadian variation in uterine artery blood flow indices during the follicular phase of the menstrual cycle. *Ultrasound Obstet Gynecol* 5 (1995) 406-410.
50. **Zandt-Stastny D, Thorsen MK, Middleton MD, et al:** Inability of sonography to detect imminent ovulation. *AJR* 152: 91, 1989.

Mejoras en el laboratorio de FIV

Amparo Ruiz A, de los Santos M^aJ

Equipo IVI

La complejidad creciente de algunas de las técnicas que se aplican en los laboratorios de embriología clínica y el mantenimiento de los embriones fuera del ambiente materno durante un tiempo más prolongado, hacen indispensables las mejoras del laboratorio para asegurar el éxito del tratamiento.

Además de las condiciones de cultivo propiamente dichas, que no analizaremos porque constituirían un capítulo a parte, existen una serie de puntos indispensables para garantizar estas condiciones óptimas de trabajo en el laboratorio.

Recursos humanos

Instalaciones del laboratorio

Dotación técnica

Condiciones Ambientales

3.- Control de calidad

Test de embriotoxicidad

Acreditación del laboratorio de FIV

1.- RECURSOS HUMANOS

Cada uno de los procedimientos que se desarrollan en un laboratorio de Fecundación in Vitro (FIV), desde la punción para la obtención de ovocitos hasta la transferencia de embriones, pasando por la manipulación de los medios de cultivo y de las muestras de semen, entrañan el mismo grado de responsabilidad, todos ellos son igualmente importantes. Descuidos y falta de atención pueden desencadenar fallos de fecundación o bloqueo del desarrollo embrionario con la consiguiente pérdida del ciclo de la paciente. Es fundamental por lo tanto, que el grado de atención sea siempre el máximo incluso en aquellos procedimientos que no impliquen la manipulación directa de embriones o gametos. Este fin se consigue siguiendo una serie de requisitos como son, asegurar una plantilla suficiente para poder realizar

todos los procedimientos sin precipitación, realización de un único procedimiento a la vez y la concienciación del personal del laboratorio a cerca de la importancia y trascendencia del trabajo que realiza.

El número de personas que componen la plantilla del laboratorio repercute en el tiempo que un embriólogo puede destinar a cada caso en concreto, así como en la agilidad mental y destreza a la hora de realizar un procedimiento en concreto. Los procedimientos que se realizan en un laboratorio son muy complejos, y muchas veces resultan largos y complicados exigiendo indudablemente concentración para evitar errores. Tasas de fecundación, calidad embrionaria y tasas de gestación, pueden verse significativamente afectadas por este tipo de variable.

El número de embriólogos y técnicos de laboratorio es por lo tanto, pieza clave en la organización del laboratorio. Este depende de las características de cada centro y debe estar en función del número y el tipo de procedimientos que se realizan al año, de la complejidad de las técnicas utilizadas y del reparto de actividades entre embriólogos y técnicos.

Una media bastante aceptable sería de 1 embriólogo por cada 100 procedimientos anuales, existen no obstante laboratorios con proporciones más desahogadas, 1 embriólogo cada 50 procedimientos o incluso más ajustadas, 1 embriólogo por cada 250 procedimientos.

Sin embargo, basar esta proporción solo en el número de ciclos no es adecuado, ya que no es lo mismo un FIV de 4 ovocitos con transferencia en día 2 de desarrollo, que un ICSI con espermatozoides de biopsia testicular de 30 ovocitos con transferencia en día 6 o la aplicación de técnicas especiales como la aspiración de fragmentos embrionarios o la biopsia embrionaria.

Debe por tanto establecerse una medida lo más

objetiva posible, que evalúe el peso de cada uno de los procedimientos.

2.- INSTALACIONES DEL LABORATORIO

a.- Dotación técnica del laboratorio

Si el número de personas que componen la plantilla del laboratorio es importante, no lo es menos el equipamiento del laboratorio. De hecho es otro de los factores limitantes del éxito de la FIV. Este, al igual que el personal, depende de las necesidades y rutina de trabajo de cada laboratorio y también está función de la cantidad de procedimientos que se realizan.

Distinguiremos dos puntos importantes en este apartado: equipos y mantenimiento.

Equipos.- La disponibilidad de cabinas de flujo laminar, microscopios estereoscópicos e invertidos, equipos de micromanipulación, incubadores, etc...son piezas importantes para el buen funcionamiento del laboratorio de embriología y permitirán realizar los procedimientos dentro del tiempo requerido para ello.

El número de cabinas de flujo laminar debe ser suficiente para no tener que realizar simultáneamente dos procedimientos en la misma cabina. En lo referente al resto del equipo, es decir, lupas estereoscópicas, microscopios invertidos, equipos de micromanipulación y equipos de congelación, debe ser suficiente para que permita no tener que retrasar la realización de un procedimiento concreto más de lo necesario.

El número de incubadores y su función es otro tema fundamental. Si bien es cierto que lo ideal sería tener un paciente por incubador, la razón de 3 pacientes por incubador es bastante razonable. La aparición de los incubadores denominados de trabajo o temporales son esenciales en el laboratorio ya que esto evitará la apertura innecesaria de los incubadores de cultivo.

Mantenimiento.- La estabilización de las condiciones de cultivo al máximo lleva asociado el mantenimiento de las condiciones de cultivo de la forma más estable posible. Una de las variables que afecta a la viabilidad de ovocitos y embriones es claramente la temperatura (1, 2). Para evitar grandes fluctuaciones de temperatura, además de la adopción de ciertas técnicas de cultivo como la utilización de ceite mineral, el equipamiento de las campanas, lupas y microscopios con plataformas atemperadas resultan altamente beneficiosas.

b.- Condiciones Ambientales

El creciente interés por el efecto de contaminantes ambientales sobre la salud y el de los embriólogos por la mejora de las condiciones de cultivo de gametos y embriones, ha creado una interesante corriente de interés de la que nace una preocupación por el impacto de las diferentes condiciones ambientales sobre el desarrollo preimplantacional de los embriones. Existen una amplia gama de productos, que por sus condiciones específicas únicamente pueden realizarse bajo las condiciones ambientales de una "cleanroom". Desde medicamentos especiales, hasta equipos ópticos de gran precisión, necesitan ser producidos o ensamblados bajo unas condiciones ambientales especiales. Resulta, por lo tanto, bastante ilógico pensar que células tan valiosas como son gametos y embriones humanos, no se vean también beneficiadas de estas condiciones especiales durante su manipulación in vitro.

En el laboratorio, gametos y embriones se ven expuestos a una serie de situaciones artificiales como son cambios de temperatura, presión de O₂ y CO₂, cambios en las condiciones de luz, temperatura, etc...que pueden afectar a su integridad y desarrollo (1-3), además de verse expuestos a sustancias con las que difícilmente llegarían a contactar de forma natural y que pueden afectar al desarrollo embrionario (4, 5).

Entre estas nuevas sustancias con las que circunstancialmente contactarán, podemos destacar: partículas de polvo, restos de vidrio, derivados del plástico, compuestos orgánicos volátiles, desinfectantes, etc.... Todas estas nuevas situaciones a las que embriones y gametos se verán expuestos pueden ser mitigadas en gran medida por la conversión de los laboratorios de FIV en cleanroom. Esta conversión no sólo facilitará el control de la calidad del aire, es decir la concentración de partículas de un tamaño determinado, y la presencia de compuestos orgánicos volátiles (VOC's), sino también la consecución de unas condiciones estables de temperatura y humedad.

La calidad del aire dentro del laboratorio de FIV va a depender no sólo del filtrado exterior sino también del laboratorio en sí. El número de personas así como la indumentaria deben tenerse en cuenta para controlar este parámetro. Sin la indumentaria adecuada, una persona puede generar alrededor de 2 millones de partículas menores de 0.5µm/min, alrededor de 300.000 partículas mayores de 0.5 µm/min y alrededor de 160 partículas con bacterias (6). Es por ello que el uso de mascarilla, gorro y calzado exclusivo resultarán imprescindibles.

De las clases de cleanroom existentes, tal vez la clase ISO 5, sería una opción bastante razonable para el laboratorio de embriología. No obstante, la utilización de las cabinas de flujo laminar puede rebajar a ISO 6 ó ISO 7 el tipo de cleanroom al que el laboratorio de FIV puede convertirse.

La utilización de cabinas de flujo laminar equipadas con filtros HEPA, permiten el paso de sólo 3 de 10.000 partículas de tamaño no superior a 0.3^o m. Estas resultan por lo tanto suficiente para evitar el paso de microorganismos, los cuales vienen normalmente unidos a otro tipo de material como restos de células de las piel, o agregados de polvo llegando a alcanzar tamaños de 10 a 15 ^om.

La adaptación del laboratorio de FIV al tipo de normativa ISO elegida y la presión positiva con respecto a estancia contiguas en el laboratorio debe ser suficiente para mantenimiento de la pureza del aire en lo que a partículas se refiere. Sin embargo, esta presurización no es suficiente para mantener el laboratorio libre de VOC. Su control en el laboratorio se deberá realizar a varios niveles esto es, a nivel de los gases que llegan a los incubadores, a nivel del aire que llega desde el exterior, y por último a nivel del producido en el interior del laboratorio. Los dos últimos apartados pueden ser controladas de forma eficaz con la utilización de los filtros basados en carbón activado y permanganato potásico instalados en los sistemas de aire que abastecen el laboratorio de FIV. El control de la posible contaminación debida a la impureza del CO₂ utilizado en incubadores, puede ser controlada adaptando un sistema de filtros instalados en el sistema de abastecimiento de gases, evitando apurar completamente las balas de CO₂ y utilizando un sistema de tuberías de canalización de gases con bajo potencial de liberación de residuos.

El control de calidad de las cleanroom, revisión de filtros, control de partículas y mediciones de VOC, será también importante para poder conservar las cualidades del aire.

Dada la dificultad de adecuar los sistemas de filtrado para el control de las partículas, microorganismos y VOC a laboratorios ya construidos, puede recurrirse a la utilización de medidas paliativas: dejar siempre el flujo laminar en marcha para que las cabinas actúen como unidades eliminadoras de partículas en el ambiente, cambiar los métodos de cultivo de gameto y embriones, instalar unidades CODA en puntos estratégicos, etc... La instalación de filtros CODA en algunos laboratorios han aumentado significativamente de las tasas de gestación, y disminuido la de abortos en FIV (7). No obstante, se debe analizar la presencia de los VOC normalmente presentes en áreas

urbanas que podrían estar afectando a los resultados de un laboratorio concreto y a partir de ahí diseñar estrategias particulares.

Existen muchos estudios sobre los efectos nocivos de los diferentes contaminantes ambientales sobre la salud. La exposición breve a determinados tipos de estos compuestos son suficientes para ser detectados en sangre, y tras su exposición más prolongada, éstos pueden atravesar la placenta y detectarse en el líquido amniótico (8, 9). Además, se sabe que su exposición continuada puede aumentar el riesgo de infecciones pulmonares (10), cáncer de pulmón (11) así como tener consecuencias de índole reproductivo (8, 12, 13).

Debido a la ubicación urbana de los laboratorios de FIV y al material utilizado para el trabajo rutinario, (rotuladores, mecheros de, productos de desinfección, microscopios, monitores de televisión, placas de plástico, etc...), no es raro que tiendan a acumularse en el ambiente diferentes tipos de VOC.

Las medidas llevadas a cabo en algunos laboratorios FIV, demuestran que determinadas prácticas alrededor del laboratorio puede dar lugar a una elevación inesperada de ciertos compuestos y que algunos de ellos pueden encontrarse en mayor concentración en el interior de los incubadores llegando a ser 5 a 6 veces la concentración encontrada en el aire exterior del laboratorio (5). Es por ello que resulta interesante conocer si la presencia de estos compuestos en los laboratorios pueden afectar a los resultados de FIV. Los datos publicados provienen de estudios realizados en otras especies animales, y en muchos casos utilizan concentraciones muy superiores a las encontradas como término medio en los laboratorios, por lo que tienen un valor parcialmente informativo, sin embargo, unidos a los resultados indirectos obtenidos de centros de reproducción asistida en los que se ha relacionado las gestaciones con la calidad del aire, pueden ofrecer una orientación a seguir frente a la presencia de ciertos VOC en los laboratorios de FIV (5, 14).

La presencia de benceno y sus derivados, tiene efectos negativos en reproducción. Inhalación de vapores de tolueno a concentraciones entre 6 y 20 veces las permitidas por la Administración de Salud y Seguridad Ocupacional americana (OHSA) son capaces de disminuir significativamente el recuento de espermatozoides y ser embriotóxico en roedores (13). La presencia de benceno en el medio de cultivo produce aneuploidías, alteraciones en la síntesis de ADN y mutaciones génicas en embriones de hámster (15), lo cual puede repercutir seriamente en la capacidad de división e implantación.

Otras sustancias como el metanol, que también puede ser encontrado en concentraciones mayores

dentro de los incubadores, también tiene efectos nocivos sobre los embriones de rata a concentraciones próximas a 300 mM, aunque no a 200 mM, el metanol tiene efectos embriotóxicos (16).

La presencia de aldehídos como la acroleína en las proximidades de los laboratorios de FIV, es otra de las circunstancias que se ha relacionado con la disminución de las tasas de gestación.

La acroleína es un aldehído que es letal para el hombre en concentraciones de 10 ppm. Las concentraciones actuales de dicho compuesto en las ciudades muy contaminadas es de alrededor de 9 ppm. Algunos estudios realizados en ratón sobre el efecto de la acroleína en el medio de cultivo demuestran que la presencia de dicho compuesto, en concentraciones del orden de 1.4 ppm, inhibe parcialmente el desarrollo hasta blastocisto mientras que concentraciones del orden de 5.6 ppm lo inhibe por completo (5).

3.- CONTROL DE CALIDAD

a. Aplicación de los controles de calidad

Los controles de calidad y la elección del tipo de test a utilizar sobre los medios de cultivo y material utilizado en el manejo de los gametos y embriones (jeringas, puntas de pipetas, placas de cultivo, etc...), es otro tema muy importante para el mantenimiento de las condiciones óptimas de trabajo. Aunque la necesidad de su realización podría ser cuestionada en algunos productos, ya que éstos están testados en sus lugares de fabricación, las condiciones de transporte y almacenamiento pueden afectar a la viabilidad de los embriones por lo que resulta aconsejable repetir los tests para mayor seguridad.

Hay descritos muchos tipos de test para comprobar la embriotoxicidad de los productos utilizados en los laboratorios de FIV. Entre ellos están los que estudian la probabilidad de que los embriones de ratón de 1 ó 2 células lleguen hasta blastocisto (17-19), o los que se basan en el índice de motilidad de espermatozoides de animales de laboratorio (20, 21), o espermatozoides humanos (22, 23).

El tipo de test más apropiado para comprobar la viabilidad de los medios y resto de material del laboratorio es un tema polémico ya que existen datos en la literatura que bien no encuentran asociación del resultado de los tests con las tasas de gestación (24-26) o que encuentran mejor asociación con los parámetros del FIV con unos test que con otros (18, 20, 21).

Puesto que los resultados pueden ser muy variables dependiendo del tipo de test realizado, del tipo de producto sobre el que se realiza, etc, ...cada labo-

ratorio debe utilizar aquel que mejor se correlacione con su tasa de desarrollo embrionario y gestación.

Otro control de calidad que debe llevarse a cabo en el laboratorio es el chequeo diario de temperaturas de los diferentes instrumentos como frigoríficos, placas calefactoras, incubadores, niveles de CO₂ de los incubadores, pH de los medios ,etc, lo que contribuirá al mantenimiento de la estandarización del trabajo diario y a la obtención de buenos resultados.

b. Acreditación del laboratorio de FIV.

Dados los riesgos que conlleva el trabajo en un laboratorio de RA. La aplicación de los controles de calidad se hacen indispensables. Estos son importantes para asegurar la reproducibilidad y la estandarización de los procedimientos que se realizan en el laboratorio y es fundamental que el personal conozca como se deben realizar. La estandarización de las condiciones de trabajo en el laboratorio no sólo facilita la agilidad y calidad del trabajo sino que permite el control rápido sobre el efecto negativo de nuevas variables que se hayan introducido así como la reproducibilidad de los resultados en diferentes laboratorios.

Muchos países tienen legislación sobre la forma de trabajo en los laboratorios de RA. En Estados Unidos, Gran Bretaña o Suecia existen organismos responsables de autorizar y ofrecer recomendaciones para la práctica de procedimientos de RA tras la colaboración con diferentes asociaciones científicas como la ASRM, ESHRE, ALPHA, etc..(27-30). En Europa, la Cooperación Europea para la Acreditación (www.european-accreditation.org) es la encargada de acreditar laboratorios de RA que pertenecen a los miembros de la Comunidad Europea. Para poder pasar con éxito sus auditorias es imprescindible que el laboratorio cumpla con un serie de requisitos relacionados con el trabajo de tipo administrativo, aspectos concernientes al laboratorio y aspectos clínicos los cuales deberán ir en la línea de las normas ISO o EN.

El laboratorio de FIV deberá tener actualizados la calibración de todos los instrumentos/ equipos, disponer de un manual que explique detalladamente todos los procedimientos que se realizan en el laboratorio, en los certificados e informes debe constar dirección del laboratorio, fecha y firma de la persona que aprueba o certifica los informes.

La estabilidad de las condiciones de cultivo de gametos y embriones estará asegurada si el trabajo en el laboratorio de FIV se lleva a cabo siguiendo unos requisitos que aseguren el control del trabajo rutinario. Aspectos como el tamaño de la plantilla, equipamiento adecuado y controles de calidad son algunos de es-

tos requisitos. El establecimiento de las condiciones óptimas de trabajo en el laboratorio de FIV es una tarea ardua y difícil, pero a las que sin duda deben tender todos los laboratorios de embriología para asegurar el éxito.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Munné S, Cohen J.:** Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod Update* 1998;4:842-55.
2. **Almeida PA, Bolton VN.:** The effect of temperature fluctuations on the cytoskeletal organisation and chromosomal constitution of the human oocyte. *Zygote* 1995;3:357-65.
3. **Noda Y, Goto Y, Umaoka Y, Shiotani M, Nakayama T, Mori T.:** Culture of human embryos in alpha modification of Eagle's medium under low oxygen tension and low illumination. *Fertil Steril* 1994;62:1022-7.
4. **Cohen J, Gilligan A., Schimmel, T., Cecchi M., Wiemer, K.:** Environmental factors affecting development of embryos. *Annual Review of Preimplantation Embriology*. Cancún, Mexico, 2001:33-40.
5. **Hall J, Gilligan A, Schimmel T, Cecchi M, Cohen J.:** The origin, effects and control of air pollution in laboratories used for human embryo culture. *Hum Reprod* 1998;13 Suppl 4:146-55.
6. **Whyte W.:** Cleanroom design. Second ed: John Wiley & Sons, 1999.
7. **Racowsky C, Jackson, K.V., Nureddin A, de los Santos, M.J., Kelley, J.R., Pan Y.:** Carbon-activated air filtration results in reduced spontaneous abortion rates following IVF. 11th World Congress on In Vitro Fertilization and Human Reproductive Genetics. Sydney, Australia, 1999.
8. **Ungvary G, Tatrai E.:** On the embryotoxic effects of benzene and its alkyl derivatives in mice, rats and rabbits. *Arch Toxicol Suppl* 1985;8:425-30.
9. **Backer LC, Egeland GM, Ashley DL, et al.:** Exposure to regular gasoline and ethanol oxyfuel during refueling in Alaska. *Environ Health Perspect* 1997;105:850-5.
10. **Diez U, Kroessner T, Rehwagen M, et al.:** Effects of indoor painting and smoking on airway symptoms in atopy risk children in the first year of life results of the LARS-study. Leipzig Allergy High-Risk Children Study. *Int J Hyg Environ Health* 2000;203:23-8.
11. **Cohen AJ, Pope CA, 3rd, Speizer FE.:** Ambient air pollution as a risk factor for lung cancer. *Salud Publica Mex* 1997;39:346-55.
12. **Hudak A, Ungvary G.:** Embryotoxic effects of benzene and its methyl derivatives: toluene, xylene. *Toxicology* 1978;11:55-63.
13. **Ono A, Sekita K, Ogawa Y, et al.:** Reproductive and developmental toxicity studies of toluene. II. Effects of inhalation exposure on fertility in rats. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1996;15:9-20.
14. **Boone WR, Johnson JE, Locke AJ, Crane MMT, Price TM.:** Control of air quality in an assisted reproductive technology laboratory. *Fertil Steril* 1999;71:150-4.
15. **Tsutsui T, Hayashi N, Maizumi H, Huff J, Barrett JC.:** Benzene-, catechol-, hydroquinone- and phenol-induced cell transformation, gene mutations, chromosome aberrations, aneuploidy, sister chromatid exchanges and unscheduled DNA synthesis in Syrian hamster embryo cells. *Mutat Res* 1997;373:113-23.
16. **Brown SK.:** Chamber assessment of formaldehyde and VOC emissions from wood-based panels. *Indoor Air* 1999;9:209-15.
17. **Fleetham JA, Pattinson HA, Mortimer D.:** The mouse embryo culture system: improving the sensitivity for use as a quality control assay for human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1993;59:192-6.
18. **Montoro L, Subias E, Young P, Baccaro M, Swanson J, Sueldo C.:** Detection of endotoxin in human in vitro fertilization by the zona-free mouse embryo assay. *Fertil Steril* 1990;54:109-12.
19. **Fleming TP, Pratt HP, Braude PR.:** The use of mouse preimplantation embryos for quality control of culture reagents in human in vitro fertilization programs: a cautionary note. *Fertil Steril* 1987;47:858-60.
20. **Bavister BD, Andrews JC.:** A rapid sperm motility bioassay procedure for quality-control testing of water and culture media. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1988;5:67-75.
21. **Rinehart JS, Bavister BD, Gerrity M.:** Quality control in the in vitro fertilization laboratory: comparison of bioassay systems for water quality. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1988;5:335-42.
22. **Critchlow JD, Matson PL, Newman MC, Horne G, Troup SA, Lieberman BA.:** Quality control in an in-vitro fertilization laboratory: use of human sperm survival studies. *Hum Reprod* 1989;4:545-9.
23. **Claassens OE, Wehr JB, Harrison KL.:** Optimizing sensitivity of the human sperm motility assay for embryo toxicity testing. *Hum Reprod* 2000;15:1586-91.
24. **Quinn P, Warnes GM, Kerin JF, Kirby C.:** Culture factors in relation to the success of human in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1984;41:202-9.
25. **van den Bergh M, Baszo I, Biramane J, Bertrand E, Devreker F, Englert Y.:** Quality control in IVF with mouse bioassays: a four years' experience. *J Assist Reprod Genet* 1996;13:733-8.
26. **Leveille MC, Carnegie J, Tanphaichitr N.:** Effects of human sera and human serum albumin on mouse embryo culture. *J Assist Reprod Genet* 1992;9:45-52.

27. **McLendon WW.:** The American Fertility Society-College of American Pathologists Collaborative Program for Accreditation of In Vitro Fertilization Embryo Laboratories. Building bridges to enhance patient care. Arch Pathol Lab Med 1992;116:317-8.
28. **Visscher RD.:** Partners in pursuit of excellence. Development of an embryo laboratory accreditation program. Arch Pathol Lab Med 1992;116:318-9.
29. **Wikland M, Sjoblom C.:** The application of quality systems in ART programs. Mol Cell Endocrinol 2000;166:3-7.
30. **Gianaroli L, Plachot M, van Kooij R, et al.:** ESHRE guidelines for good practice in IVF laboratories. Committee of the Special Interest Group on Embryology of the European Society of Human Reproduction and Embryology. Hum Reprod 2000;15:2241-6.

Criopreservación de espermatozoides en situaciones límite

Bassas LI, Mata A

Laboratorio de Andrología y Embriología. Fundació Puigvert, Barcelona

INTRODUCCIÓN

La criopreservación de semen se empezó a realizar en la mayoría de centros de reproducción asistida con el propósito inicial de garantizar la seguridad microbiológica y virológica de los especímenes de semen procedente de donantes, permitiendo la realización de estudios serológicos tras períodos prolongados de cuarentena. Sin embargo, la metodología y la infraestructura desarrollada abrió la puerta a la criopreservación preventiva de semen (CPS) o autoconservación en hombres jóvenes que precisaban de tratamientos agresivos basados en fármacos citostáticos y/o radioterapia, con alta toxicidad gonadal. Durante las últimas dos décadas diversos bancos de semen han acumulado experiencia en el manejo de estos pacientes (Kelleher y cols., 2001; Lass y cols., 2001). En combinación con el perfeccionamiento de las técnicas de reproducción asistida que paralelamente ha tenido lugar, los gametos de estos pacientes, criopreservados preventivamente, pueden ser utilizados años más tarde para conseguir descendencia, con resultados similares a los de otras causas de esterilidad (Mahadevan y cols., 1983; Padron y cols., 1997; Bassas y cols., 2000). Esta conjunción ha facilitado una progresiva ampliación de la procedencia de los gametos y las indicaciones a tratar.

En pacientes afectados de esterilidad conyugal, los espermatozoides obtenidos por métodos quirúrgicos en el conducto deferente, el epidídimo o el testículo pueden ser criopreservados con éxito en azoospermias obstructivas, y también en muchos casos de lesión secretora testicular.

Aunque la evolución de la criobiología ha conseguido establecer procedimientos razonablemente eficaces para la criopreservación de espermatozoides, los efectos de la congelación y la descongelación to-

davía son letales para el 35-50% de las células que sufren este proceso. Las células supervivientes pueden sufrir lesiones estructurales y cambios metabólicos que limitan su función biológica (Alvarez y Storey, 1993). Por otra parte, la propia naturaleza de las enfermedades que sufren los hombres candidatos a CPS, y a veces los tratamientos recibidos previamente, deterioran gravemente la espermatogénesis. Finalmente, diversos aspectos derivados de la CPS plantean problemas clínicos, éticos y legales de considerable entidad. Es razonable por tanto que el profesional en contacto con estas situaciones se pregunte si existen límites en la congelación de espermatozoides, y en su caso cuáles son.

MANEJO CLÍNICO Y MÉTODOS DISPONIBLES

Tumores malignos y enfermedades graves

Las indicaciones potenciales para la CPS son aquellas enfermedades graves que afectan más frecuentemente a hombres jóvenes y a adolescentes. Los tumores testiculares malignos y los linfomas constituyen el 30% y el 20% de las indicaciones, respectivamente (Bassas y cols., 2000; Kelleher y cols., 2001). A cierta distancia le siguen las alteraciones urológicas, leucemias y los tumores sarcomatosos (5-10% para cada diagnóstico). Un tercer grupo está constituido por enfermedades inflamatorias, colagenosis, insuficiencia renal crónica, y otros tumores menos frecuentes en este grupo de edad. El deseo de conservar semen antes de someterse a anticoncepción definitiva (vasectomía) puede considerarse una indicación electiva a tener en cuenta, aunque con clara tendencia a la baja durante los últimos años.

Ninguna de las entidades mencionadas debe consi-

derase a priori como excluyente para la CPS (Naysmith y cols., 1998). De todos modos, la perspectiva de un tratamiento altamente tóxico, como la combinación de radioterapia y quimioterapia para trasplante de médula ósea, la procabazina, las mostazas nitrogenadas, o la radioterapia aislada a dosis totales superiores a 40 Gy refuerzan la conveniencia de la CPS. Al contrario, las pautas de quimioterapia preventiva basadas en cisplatino o carboplatino que se dan en tumores testiculares localizados, suelen presentar una buena recuperación de la espermatogénesis, tras un período de oligozoospermia o azoospermia transitoria (Tabla 1). A pesar de los efectos conocidos de los distintos regímenes terapéuticos, no es posible pronosticar el riesgo individual de quedar azoospermico con suficiente fiabilidad. La variabilidad en el grado de lesión testicular permanente está relacionada con la afectación producida por la propia enfermedad de base, y también con la susceptibilidad individual de los pacientes. Por este motivo se aconseja proceder a la CPS incluso cuando el riesgo es relativamente bajo.

Resulta altamente recomendable realizar el proceso de CPS en un programa de atención clínica integral (Kelleher y cols., 2001; Lass y cols., 2001). Los objetivos generales de dicho programa son la evaluación andrológica, la información, el seguimiento y el asesoramiento y eventual tratamiento reproductivo. Debe empezar con la anamnesis general y específica sobre fertilidad. Es especialmente importante detallar la información disponible sobre la enfermedad que motiva la solicitud de CPS, así como el plan de tratamiento inmediato previsto. La administración de tandas de quimioterapia o radioterapia recibidas durante los meses anteriores puede condicionar la idoneidad de la congelación, puesto que se asocian a empeoramiento severo de la calidad seminal y a lesiones cromosómicas. La exploración física debe incluir la medición del volumen y la consistencia testicular. Hay que realizar análisis de antígeno de superficie de hepatitis B, y anticuerpos para hepatitis C, VIH y CMV. Los especímenes congelados deberán mantenerse en cuarentena hasta comprobar de nuevo la negatividad

Tabla 1
*Parámetros seminales previos a la CPS y recuperación después del tratamiento**

Grupo diagnóstico:	I	II	III	IV	V
Pacientes [n]	8	14	2	17	11
Edad al realizar la CPS [años]	25,3 (20-32)	26,9 (22-40)	31 (29-33)	26,1 (17-46)	25,7 (13-35)
Espermatozoides por eyaculado en semen basal [millones]	134,6 (13,5-455)	129,5 (0-800)	17,7 (3,5-32)	129,7 (3-480)	77 (0,05-390)
Movilidad progresiva en semen basal [%]	50,7 (36-59)	22 (0-54)	60 (52-68)	32,4 (14-61)	25,4 (0-70)
Motilidad progresiva Criosupervivencia [%]	18,5 (9-26)	9,4 (0-23)	11 (0-22)	18,5 (2-50)	10,9 (0-23)
Tiempo desde CPS hasta reevaluación [años]	4 (1-12)	3,2 (1-8)	1	4,2 (1-9)	2,4 (1-8)
Espermatozoides por eyaculado en la reevaluación [millones]	31,4 (0-210)	102,9 (0,1-480)	142,5 (90-195)	82,8 (0-360)	62,1 (0-213)
Movilidad progresiva en la reevaluación [%]	25,8 (0-60)	36,2 (0-70)	50,5 (21-80)	43 (0-65)	30,7 (0-61)
Variación absoluta del número de gametos con motilidad progresiva por eyaculado [millones]	-38,1 (-102-1,8)	35,9 (0-152)	53 (34-72)	41,7 (-24,5-108)	-11,5 (-167-61)

* Media (rango)

r I. Tumores testiculares malignos (linfadenectomía + quimioterapia)

II. Tumores testiculares malignos (quimioterapia)

III. Tumores de células de Leydig (orquiectomía)

IV. Linfomas (quimioterapia + radioterapia)

V. Grupo mixto: Leucemias (3), Carcinoma papilar tiroideo + linfoma (1), sarcoma (1),

cervicotomías (2), IRC (1), astrocitoma (1), aplasia medular (1), seminoma + leucemia mieloide aguda (1)

de la serología infecciosa. La información es un aspecto esencial en la atención de los pacientes candidatos a CPS. Teniendo en cuenta que en la actualidad el coste del mantenimiento del semen congelado recae sobre los propios pacientes, deben quedar claras cuáles son las expectativas de fertilidad para el futuro, considerando de forma individual el riesgo de esterilidad.

Recuperación de la espermatogénesis

La recuperación de la producción espermática depende primariamente del tipo de régimen terapéutico recibido, y secundariamente de la indicación o patología que presentan los pacientes (Howell y Shalet, 2001). Por esta razón se ofrecerá un seguimiento clínico tras la congelación de semen, preferentemente después de haber completado la fase de tratamiento. En esta visita se puede evaluar la recuperación seminal, decidir si procede continuar con el mantenimiento del semen congelado, y realizar un asesoramiento reproductivo, en una situación menos angustiada para el paciente. El plazo de tiempo que debe transcurrir para dicha evaluación dependerá del tipo de tratamiento recibido (mayor cuanto más agresivo), de la remisión del proceso de base y de los resultados seminales previos a la congelación. En general se recomienda esperar al menos un año desde el final de la terapia, y dos años si el paciente es joven y no se plantea la procreación en breve.

Pacientes estériles con azoospermia

En pacientes estériles con azoospermia idiopática en los que está indicada una biopsia testicular para diagnóstico histológico y/o estudio de cromosomas meióticos, debe considerarse la obtención de pulpa testicular adicional para extracción y, en su caso congelación, de espermatozoides (Buch y cols., 1994; Chan y cols., 1995; Oates y cols., 1997). Sin embargo, la realización de tal maniobra no es siempre obligada, ni debe realizarse automáticamente. Hay que tener en cuenta, en primer lugar, que los resultados de las técnicas de reproducción asistida son inferiores con material criopreservado, si se consideran series grandes de pacientes. Además, la congelación de espermatozoides testiculares no está exenta de consecuencias asistenciales, puesto que introduce un elemento de presión en la elección terapéutica de las parejas estériles. En ciertos casos de riesgo genético, y en otras circunstancias en las que una pareja está indecisa acerca de la mejor opción de paternidad, es aconsejable no alterar el proceso de decisión con una

extracción espermática no solicitada expresamente. Los sujetos en los que ya se conoce la naturaleza obstructiva de una azoospermia, se beneficiarán preferentemente de una primera extracción testicular simultánea a la ICSI. Los pacientes azoospermicos en los que se sospecha una lesión primaria testicular presentan mayor dificultad. En general las mayoría de expertos se inclinan por el beneficio informativo y pronóstico que aporta la realización de una biopsia con extracción espermática, con criopreservación si se encuentran suficientes gametos. Un resultado negativo en el intento de extracción espermática testicular, junto con un dictamen histológico que confirme una lesión tubular severa, comporta un mal pronóstico en sucesivos intentos. Si a pesar de ello se toma la decisión de realizar un nuevo intento de extracción testicular, las mejores opciones pasan por una biopsia a cielo abierto ampliada, o bien múltiples biopsias en distintas regiones testiculares.

Evaluación espermática

El estudio de las características seminales en los especímenes que se pretenden congelar aportará información para el futuro, en el caso que deban usarse como reserva de fertilidad. Especialmente importante es la estimación de la capacidad fecundante y el tipo de TRA resulta más adecuado en función de las características de los gametos congelados. Para ello, hay que realizar un seminograma citomorfológico completo siguiendo las directrices de OMS (WHO, 1999). Si la movilidad espermática está disminuida deberá hacerse un estudio de la integridad de membranas de la cabeza con el método de exclusión de eosina, y del flagelo mediante la prueba de endósmosis inducida (HOS). De este modo se determina con mayor precisión la vitalidad de los espermatozoides antes de la congelación, lo cual servirá de referencia para el momento de la descongelación. Se pueden concentrar los espermatozoides en caso necesario mediante centrifugación, aunque esto también aumenta la cantidad de células y detritus. La aplicación de métodos de selección espermática es poco útil para mejorar la calidad del espécimen a congelar.

Congelación

La congelación de espermatozoides requiere de la adición previa de un medio crioprotector (Tabla 2). Todos los productos están basados en glicerol a una concentración final entre el 6 y el 7,5% (Nijs y Ombelet, 2001) más otros productos con acción tampo. Las formulaciones clásicas contenían yema de

Tabla 2
Principales medios crioprotectores para espermatozoides

	glycerol+ yema + citrato	TEST-yolk	HSPM
Glicerol (% v/v)	7,5	6	7,5
Yema de huevo (% v/v)	10	10	—
Tampón bipolar	—	TRIS (3 mM) + TES (7 mM)	HEPES (10 mM)
Citrato (% v/v)	0,6	0,6	—
Glicina (% v/v)	0,5	—	0,5
Otros productos	glucosa	fructosa	tyrode modificado
Antibióticos	penicilina estreptomina	penicilina estreptomina	kanamicina
Proporción medio:semen	1:1 o 1:2	1:1	1:1

huevo, aunque Mahadevan y Trounson (1983) propusieron un medio basado en una solución de Tyrode modificada, con glicerol y glicina, y tamponada con HEPES. Sin embargo, es posible que la presencia de yema de huevo tenga ventajas para la protección de las membranas celulares, especialmente en los especímenes seminales de baja calidad y en gametos inmaduros, como los que se encuentran en testículo (Hallak y cols., 2000). Se ha descrito también que la adición de ciertas sustancias, como la pentoxifilina, o un derivado de la fosfatidilcolina, el factor activador de las plaquetas (PAF) incrementan la movilidad espermática tras la congelación. Esto resulta especialmente útil en el caso de gametos con muy baja movilidad (Alvarez y Storey, 1993).

El proceso de congelación debe facilitar la entrada del crioprotector y una deshidratación celular progresiva para inhibir la formación de cristales intracelulares. Esto se consigue enfriando la mezcla a un ritmo controlado. Entre los diferentes sistemas usados habitualmente, el método manual en vapor de nitrógeno líquido es el utilizado más a menudo en los bancos de semen. Los congeladores biológicos programables consiguen un mejor control de la cinética de la congelación, aunque no se ha conseguido demostrar que sean superiores al método manual (Yin y Seibel, 1999). En general, y a pesar de que existen importantes diferencias interindividuales, la criosupervivencia relativa suele ser parecida en muestras de variada calidad. Por este motivo, la mejor forma de evaluar el grado de lesión inducida por la congelación es reservar una pequeña alícuota para la descongelación. La concentración de espermatozoides que han sobrevivido y presentan movilidad puede usarse como índice

de la calidad que encontraremos, y determinará la elección de la técnica de reproducción.

La forma de realizar la descongelación debe ser consistente con el método empleado para la congelación. Cuando la velocidad de enfriamiento ha sido rápida, la descongelación también se practicará a un ritmo de calentamiento rápido. Esto se consigue colocando los viales o pajuelas en un baño a 37° C durante unos minutos.

LÍMITES EN FUNCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES

Semen

Diversas patologías para las que la CPS está indicada se acompañan de alteraciones seminales antes incluso del inicio de cualquier tratamiento (Tabla 1). Las características seminales mínimas que se consideran necesarias para que sea factible la CPS han variado considerablemente a la baja desde la introducción de la ICSI. A mediados de los años ochenta, cuando se iniciaron los programas de autoconservación de semen en nuestra Institución y en otros centros, se consideraba que la criosupervivencia debía llegar a un millón de espermatozoides móviles por mL para que la CPS fuera rentable. En la actualidad, las únicas limitaciones absolutas son la azoospermia o la ausencia total de movilidad en el momento de plantear la conservación. Sin embargo, cuando se encuentran menos de 10.000 gametos móviles por mL puede cuestionarse la rentabilidad clínica de la CPS (Hallak y cols., 2000b). Algunos grupos no con-

sideran que la ausencia de movilidad deba ser un motivo necesario de exclusión, porque es posible que en el futuro se perfeccionen todavía más las TRA, y se desarrollen nuevos métodos para evaluar la funcionalidad de los gametos. En la actualidad, las técnicas disponibles para evaluar de la viabilidad celular (eosina, HOS) son buenos indicadores pronósticos en casos de astenozoospermia extrema.

El número mínimo de dosis a congelar depende habitualmente del volumen seminal y de la disposición del paciente para realizar varias donaciones. También se reducirá el número de dosis si es necesario concentrar la muestra. Por otra parte, aunque las garantías de futura gestación son mayores al congelar muchos viales o pajuelas, diversas consideraciones prácticas aconsejan limitar el número máximo. Nuestro criterio es que un máximo de 15 viales por paciente son una reserva suficiente en la mayoría de los casos. Para un paciente oncológico con una calidad aceptable, esto supondrá la posibilidad de realizar varios ciclos de inseminación conyugal y de fecundación in vitro.

Testículo

Los pacientes azoospermicos en los que se plantea una recuperación espermática quirúrgica (REQ) constituyen una entidad claramente diferenciada de los sujetos oncológicos. Por las características de los gametos que se encuentran en la vía seminal y en el testículo, y teniendo en cuenta que los resultados obtenidos mediante ICSI, puede ser suficiente obtener unos pocos espermatozoides para conseguir gestación en la mayoría de los casos. Las azoospermias obstructivas no suelen plantear problemas en este sentido, y tanto la REQ como la congelación son casi

siempre factibles. Los espermatozoides procedentes del deferente, el epidídimo y el testículo muestran una criosupervivencia relativa similar (medida con tinciones ultravioletales) aunque la pérdida de la motilidad es más aparente en el deferente y el epidídimo. El empleo del test HOS identifica más espermatozoides vivos que la motilidad, y no está claro si los espermatozoides inmóviles pero HOS positivos conservan buena capacidad fecundante (Bachtell y cols., 1999).

En casos de azoospermia no obstructiva con grave alteración tubular, la identificación de incluso algunos espermatozoides puede ser una labor extremadamente difícil y laboriosa. Habitualmente existe una excelente correlación entre el patrón histológico encontrado y el número de gametos recuperados (Tabla 3). Las lesiones destructivas graves, con aplasia germinal completa y esclerosis tubular masiva son los que comportan mayor dificultad. El éxito en estos casos dependerá de la existencia de pequeños focos en los que se conserven algunos túbulos con espermatogénesis residual. La estrategia deberá basarse en la obtención de una mayor cantidad total de pulpa testicular, extraída en una o varias zonas del testículo, y en un prolongado tiempo de búsqueda. Si la concentración de una muestra es de 1000 espermatozoides por mL, con una movilidad del 10%, será necesario emplear una hora aproximadamente para encontrar un espermatozoide móvil en el momento de realizar la ICSI, asumiendo un tiempo de 5 minutos por cada microlitro de material analizado. Si se opta por utilizar material criopreservado con estas características, el tiempo necesario podría incrementarse considerablemente. Cohen y cols. (1997) describieron un método de ubicar los espermatozoides obtenidos en estos casos mediante su encapsulación en zonas pelúcidas de ratón, hamster o humano antes de la congelación.

Tabla 3
*Variables clínicas y espermáticas en recuperación espermática quirúrgica**

Diagnóstico Histológico	N	Espermatozoides totales [millones]	Motilidad [%]	FSH [U/L]	REQ positiva [%]
Normalidad (Obstrucción)	24	1,3 ± 1,1	4,1 ± 3,8	4,6 ± 3,2	100
Hipoespermatogénesis Atrofia mixta	11	0,3 ± 0,3	2,8 ± 1,6	6,4 ± 0,27	100
Bloqueo severo espermatozocito primario	9	0,05 ± 0,03	2,15 ± 2,4	10,6 ± 7,8	100
Aplasia germinal	4	0	0	18,2 ± 9,5	0
* media ± DE					

De este modo consiguieron recuperar más fácilmente la mayoría de los espermatozoides previamente congelados, con buenas tasas de fecundación. De todos modos, no ha habido publicaciones posteriores utilizando de este procedimiento, y no parece que esta técnica sea empleada por otros grupos.

LÍMITES POR LAS CARACTERÍSTICAS DEL SUJETO

Situación clínica

Según nuestra experiencia, las enfermedades más frecuentes en la indicación de CPS (tumores testiculares malignos y linfoma de Hodgkin) se acompañan de una moderada reducción de la calidad seminal. En la enfermedad de Hodgkin no existe relación entre el estadio clínico y la calidad seminal (Agarwal, 2000). En los tumores testiculares malignos se puede demorar la CPS hasta después de realizar la orquiectomía y determinación del estadio, sin que por ello se resienta la calidad seminal (Silbert y cols., 1999). El seminograma suele estar más severamente afectado en leucemias, que habitualmente cursan con una importante repercusión sistémica. Los tumores de células de Leydig también presentan oligoastenozoospermia severa, a causa de la actividad hormonal del propio tumor. Afortunadamente la mayoría de estos tumores son benignos, por lo que se suele ver una recuperación seminal después de la cirugía.

Edad

En niños y adolescentes la CPS comporta especiales dificultades. Obviamente, el grado de maduración somática y el estadio puberal alcanzado condicionan la posibilidad de producir semen por masturbación, y de obtener espermatozoides. Pero además, la información y obtención de consentimiento en tales casos es un tema delicado y poco sistematizado. Existen dificultades para hacer compatible la conveniencia de preservar la fertilidad en jóvenes con la necesidad de no ejercer una excesiva presión, a fin de no crear conflictos psicológicos. El asesoramiento debería ser capaz de hacer comprender al interesado las implicaciones que se derivan del hecho de congelar semen (Bahadur y cols., 2001). El papel de los padres debería facilitar el intercambio de información entre el joven y los facultativos, ayudando a estos en la labor de transmisión y asimilación. Sin embargo, a menudo los padres están más preocupados por las consecuencias generativas del proceso que el propio interesado,

y también ellos pueden requerir un cierto esfuerzo de contención.

Se ha descrito la aplicación de electroeyaculación como alternativa a la masturbación en adolescentes en este tipo de situaciones. De este modo se obtienen especímenes de baja calidad en general (Howay y cols., 2001), pero siempre en número superior a la biopsia testicular. La biopsia testicular es un procedimiento reservado a conservar células germinales no diferenciadas (espermatogonias) en niños que no han iniciado la pubertad ni la espermatogénesis, con el propósito de conseguir una maduración *in vitro* en futuro, confiando en los previsibles avances de la biología. En ningún caso debe considerarse una forma de criopreservación rutinaria.

Fallecimiento

A pesar de que la reproducción post-mortem no está relacionada directamente con el tratamiento de la esterilidad, la legislación española dedica alguna atención a regular el uso del material reproductivo masculino en caso de que se produzca el fallecimiento del varón después la criopreservación. El principal requerimiento para el uso de espermatozoides post-mortem es la necesidad de contar con el consentimiento expreso del hombre, en forma de escritura pública o testamento (Ley 35/1988, Art. 9). La receptora de los gametos será la esposa del fallecido, aunque puede usarse para fecundación en otra mujer distinta si tal extremo se hiciera constar en el consentimiento (RD 423/96, Art. 7.2). Esta necesidad constituye la principal limitación para el uso del semen criopreservado. La otra limitación se refiere a la necesidad de usar los espermatozoides dentro de los 6 meses siguientes al fallecimiento. Entre los pacientes que realizan CPS es conveniente plantear explícitamente la posibilidad de cumplimentar un documento de estas características. Ciertamente se trata de una labor delicada, que debe hacerse con suma cautela, aunque sólo en algunos pocos casos se llega a hacer efectiva la procreación mediante estos gametos (Kelleher et al, 2001).

Puesto que la obtención de un documento de últimas voluntades de acuerdo con la ley requiere una considerable previsión por parte del potencial usuario, es posible encontrar situaciones en las que se planteen dudas. En tales casos la decisión de autorizar el uso de los gametos deberá ser tomada por un juez. Existe jurisprudencia en nuestro país en que se podría aceptar como documento público a un formulario de consentimiento para realizar técnicas de reproducción asistida (Ochoa y cols., 2001).

Más difícil de aceptar resulta la petición de criopreservación hecha por la familia (padres, novia, esposa) de un hombre en situación crítica o muerte clínica (Finnerty y cols., 2001). En estos casos se añade la complejidad de la premura en el tiempo, y la falta de experiencia de los servicios que atienden a estos pacientes. Durante los últimos 4 años hemos recibido consultas o solicitud de información en 6 casos, todos ellos procedentes de servicios urgencias o unidades de cuidados intensivos. En dos ocasiones se llegó a solicitar permiso judicial, siempre con resolución negativa por falta de la correspondiente autorización.

En caso de fallecimiento, los gametos pueden ser extraídos varias horas después de la parada cardíaca manteniendo la capacidad para generar embriones y gestación (Check y cols., 1999). El método más adecuado es la epididimectomía o la orquiectomía, con posterior tratamiento de la pieza para extracción testicular convencional.

Otras limitaciones

Los aspectos económicos pueden constituir una limitación considerable para la conservación de semen. Puesto que en la actualidad los costes de mantenimiento no son asumidos por los servicios de salud pública de las distintas comunidades, es el propio interesado el que deberá asumir los gastos, que pueden ser de 200 a 340 q anuales.

La actitud de los facultativos responsables de los pacientes posibles candidatos a CPS (oncólogos, hematólogos) todavía muestra que los protocolos de manejo no siempre contemplan esta posibilidad. En una encuesta realizada en EEUU (Zapalka y cols., 1999), los propios especialistas en oncología indicaron que a menudo eran los pacientes quienes inicialmente planteaban la posibilidad de autoconservación de semen. Pocos médicos conocían las posibilidades y los resultados de la ICSI.

LÍMITES EN LA UTILIZACIÓN DE ESPERMATOZOIDES

Pérdida de seguimiento

La utilización de los especímenes congelados preventivamente suele ser baja en la mayoría de las series publicadas. Sólo un 7% de los hombres (9% de los supervivientes) demandaron la utilización de muestras previamente congeladas tras un período medio de 3 años (Kelleher y cols., 2001). Estos bajos porcentajes se confirman en otras series (Lass y cols.,

2001), y parecen obedecer a varias razones. Por una parte, muchos de los pacientes recuperan parcial o totalmente su capacidad espermatogénica. Sin embargo, es frecuente que los propios interesados dejen de acudir a los controles propuestos, y se pierda el seguimiento de su situación.

Riesgo genético

Las consecuencias genéticas de los tratamientos con citostáticos y radioterapia no parecen ser permanentes. Los datos epidemiológicos disponibles indican que después de uno o dos años no existe riesgo genotóxico significativo. Existe limitada experiencia en la utilización de espermatozoides obtenidos poco después de la aplicación de quimioterapia en pacientes que previamente no habían conservado semen. En una pequeña serie de 10 sujetos, la recuperación quirúrgica de espermatozoides fue posible en el 40% de ellos, consiguiéndose algunas gestaciones sin evidencia de anomalías (Tournaye, 2000). De todos modos, siempre que sea posible se intentará realizar la CPS antes del inicio de cualquier tratamiento, y en todo caso después de haber transcurrido al menos 6 meses desde su finalización.

Almacenamiento

El riesgo potencial de fallos en el sistema de criopreservación, que pueda ocasionar oscilaciones de la temperatura en los contenedores, está directamente relacionado con el tiempo de almacenamiento (Carrell, 1996). A este respecto, hay que señalar que la mayoría de los bancos de semen utilizan sistemas rudimentarios de control, que no siempre garantizan que los especímenes permanezcan en la fase líquida del nitrógeno, ni están provistos de sistemas de control de nivel ni alarmas. La única medida de seguridad que se menciona en la legislación es un sistema de protección contra robo (Real Decreto 413/1996, Art. 11.3). Otros riesgos relacionados con el tiempo de almacenamiento son la contaminación cruzada de los especímenes por agentes infecciosos procedentes de otras muestras, especialmente si se rompen las pajuelas que los contienen. A este respecto se aconseja mantener en cuarentena las muestras hasta conocer los resultados de la serología de control. Una posible alternativa, de la que no se tiene experiencia suficiente, sería conservar los espermatozoides en contenedores en fase de vapor.

Tiempo de congelación

El efecto específico del tiempo de almacenamien-

to depende de la temperatura a la que se conservan las células. Diversos estudios han mostrado que la temperatura del nitrógeno líquido (-196 °C) es la más adecuada para minimizar efectos deletéreos sobre la viabilidad a largo plazo. Todas las reacciones químicas se paralizan a esta temperatura, por lo que la maquinaria celular queda en estado quiescente de forma indefinida. Los únicos fenómenos conocidos que se pueden producir a dichas temperaturas son la movilidad de protones, sin trascendencia biológica, los efectos de la radiación cósmica, y la radiación local o interna, debida a la presencia de isótopos radiactivos (C14) presentes en el material biológico, que podrían lesionar el material genético. Estos efectos se ven reducidos por la influencia de la baja temperatura, por la acción radioprotectora de los criopreservantes como el glicerol, y por la relativa inaccesibilidad del ADN, muy condensado en los espermatozoides. Los estudios realizados no muestran alteraciones cromosómicas tras la criopreservación (Chernos y Martin, 1989). A partir de estos supuestos, se ha calculado que los espermatozoides podrían conservarse durante muchos años sin riesgo apreciable de mutaciones (Ashwood-Smith, 1977; Schneider, 1986). Los estudios experimentales realizados en semen no muestran reducción de la movilidad tras 10 años de congelación (Sherman, 1972). Algunos autores han observado incluso un incremento en la fecundabilidad del semen conservado durante 8 años, en comparación con períodos menores de 2 años (David, 1982).

La legislación de algunos países que han promulgado normas sobre esta materia no es homogénea. En Inglaterra, la "Human Fertilisation and Embryology Act" limita a cinco años el período de conservación para espermatozoides (Schedule 2, Paragraph 2). La legislación francesa no menciona plazos para la conservación de semen (Ley 94/654 de 1994, Art. 152.3). Otros países, como Dinamarca, Alemania, Suecia o Noruega tampoco contemplan ninguna limitación temporal para la conservación de semen.

La legislación española limita el plazo de conservación de semen a cinco años (Ley 35/1988, Art. 11). Aunque no se mencionan las razones por las que se estableció esta limitación, es posible que los asesores que elaboraron el texto no tuvieran total certeza acerca de la seguridad de la criopreservación a largo plazo. Además, el texto legal está pensado básicamente para el semen procedentes de donantes anónimos. La Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida, en su primer informe (Ministerio de Sanidad y Consumo, 1998) propuso la eliminación de cualquier límite temporal en la CPS. A pesar de la limitación legal existente, no se planteado ningún conflicto

en los centros que prolongan la conservación más allá de los límites legales.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Agarwal A.:** (2000) Semen banking in patients with cancer: 20-year experience. *Int J Androl*, 23 suppl 2:16-19.
2. **Alvarez JG, Storey BT.:** (1993) Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: glycerol and other polyols as sole cryoprotectant. *Journal of Andrology*, 14:199-209.
3. **Ashwood-Smith.:** (1977) Genetic stability of cellular systems stored in the frozen state. The freezing of mammalian embryos. Ciba Foundation, Elsevier, Amsterdam.
4. **Bachtell NE, Conaghan J, Turek PJ.:** (1999) The relative viability of human spermatozoa from the vas deferens, epididymis and testis before and after cryopreservation. *Hum Reprod*, 14:3048-3051
5. **Bahadur G, Whelan J, Ralph D, Hindmarsh P.:** (2001) Gaining consent to freeze spermatozoa from adolescents with cancer: legal, ethical and practical aspects. *Hum Reprod*, 16:188-193.
6. **Bassas L, Mata A, Navas M, García A, López O.:** (2000) Criopreservación preventiva de semen en hombres sometidos a tratamientos inductores de esterilidad: seguimiento clínico y reproductivo. *Urol Integr Invest*, 5:20-26.
7. **Buch JP, Philips KA, Kolon TF.:** (1994) Cryopreservation of microsurgically extracted ductal sperm: pentoxifylline enhancement of motility. *Fertility and Sterility*, 62:418-420.
8. **Carrell DT, Wolcox AL, Urry RL.:** (1996) Effect of fluctuations in temperature encountered during handling and shipment of human cryopreserved semen. *Andrologia*, 28:315-319.
9. **Chan YM, Abuzeid MI, Sasy MA, Beer MR.:** (1995) Pregnancy achieved by intracytoplasmic injection of cryopreserved epididymal sperm microsurgically aspirated from a man with long-term vasectomy. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 12:341-343.
10. **Check M, Summers-Chase D, Check JH, Choe J, Nazari A.:** (1999) Sperm extracted and cryopreserved from testes several hours after death results in pregnancy following frozen embryo transfer: case report. *Arch Androl*, 43:235-237.
11. **Chernos JE, Martin RH.:** (1989) A cytogenetic investigation of the effects of cryopreservation on human sperm. *American Journal of Human Genetics*, 45:766-777.

12. **Cohen J, Garisi GJ, Congedo-Ferrara TA, Kieck KA, Schimmel TW, Scout RT.:** (1997) Cryopreservation of single human spermatozoa. *Hum Reprod*, 12:994-1001.
13. **Finnerty JJ, Thomas TS, Boyle RJ, Howards SS, Karns LB.:** (2001) Gamete retrieval in terminal conditions. *Am J Obstet Gynecol*, 185:300-307.
14. **Hallak J, Sharma RK, Wellstead C, Agarwal A.:** (2000) Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of TEST-yolk buffer and glycerol. *Int J Fertil Womens Med*, 45:38-42.
15. **Howay Y, Dan-Goor M, Yaffe H, Almagor M.:** (2001) Electroejaculation before chemotherapy in adolescents and young men with cancer. *Fertil Steril*, 75:811-3.
16. **Howell SJ, Shalet SM.:** (2001) Testicular function following chemotherapy. *Hum Reprod Update*, 7:363-369.
17. **Kelleher S, Wishart SM, Liu PY, Turner L, Di Pierro I, Conway AJ, Handelsman DJ.:** (2001) Long-term outcomes of elective human sperm cryostorage. *Hum Reprod*, 16:2632-2639.
18. **Lass A, Akagbosu F, Brinsden P.:** (2001) Sperm banking and assisted reproduction treatment for couples following cancer treatment of the male partner. *Hum Reprod Update*, 7:370-377.
19. **Mahadevan MM, Trounson AD, Leeton JF.:** (1983) Successful use of human semen cryobanking for in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 40:340-343.
20. **Naysmith TE, Blake DA, Harvey VJ, Johnson NP.:** (1998) Do men undergoing sterilizing cancer treatments have a fertile future? *Hum Reprod*, 13:3250-3255.
21. **Nijs M, Ombelet W.:** (2001) Cryopreservation of human sperm. *Hum Fertil (Camb)*, 4:158-163.
22. **Oates RD, Mulhall J, Burgess C, Cunningham D, Carson R.:** (1997) Fertilization and pregnancy using intentionally cryopreserved testicular tissue as the sperm source for intracytoplasmic sperm injection in 10 men with non-obstructive azoospermia. *Human Reproduction*, 12:734-739.
23. **Ochoa C, López Arregui E, Díaz-Muñoz B.:** (2001) ICSI con espermatozoides testiculares obtenidos post mortem. *Actualidad Andrológica*, 9:80-83.
24. **Padron OF, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A.:** (1997) Effects of cancer on spermatozoa quality after cryopreservation: a 12-year experience. *Fertility and Sterility*, 67:326-331.
25. **Schneider U.:** (1986) Cryobiological principals of embryo freezing. *Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, 3:3-9.
26. **Sherman KJ.:** (1972) Long-term cryopreservation of motility and fertility of human spermatozoa. *Cryobiology*, 9:332.
27. **Silbert L, Rives N, Rey D, MacE B, Grise P.:** (1999) Semen cryopreservation after orchidectomy in men with testicular cancer. *BJU Int*, 84:1038-1042.
28. **Tournaye H.:** (2000) Storing reproduction for oncological patients: some points for discussion. *Mol Cell Endocrinol*, 169:133-136.
29. **World Health Organization** (1999) WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th Edition. Cambridge University Press. Cambridge.
30. **Yin HZ, Seibel MM.:** (1999) Human sperm cryobanking. Use of modified liquid nitrogen vapour. *J Reprod Med*, 44:87-90.
31. **Zapzalka DM, Redmon JB, Pryor JL.:** (1999) A survey of oncologists regarding sperm cryopreservation and assisted reproductive techniques for male cancer patients. *Cancer*, 86:1812-1817.

Racionalización de los tratamientos de reproducción

Matorras R.

Departamento de Obstetricia y Ginecología. Hospital de Cruces. Universidad del País Vasco

En el tratamiento de la pareja estéril, el empleo de los recursos terapéuticos de la manera más adecuada es objeto de continuo debate. La principal dificultad del abordaje de dicho problema es establecer cual va a ser el objetivo de nuestro análisis. En una primera apreciación parecería evidente de que de lo que se trata es de obtener un recién nacido sano. Sin embargo, hay determinados objetivos secundarios que dificultan el análisis : 1) que el hijo sea un hijo genético de la pareja, 2) que sea producto de un embarazo simple, 3) que se consiga lo más rápido posible, con el menor coste y con el menor riesgo, 4) que se cure la patología subyacente, 5) que se consiga mediante el coito, 6) que sea compatible con los planteamientos éticos y psicológicos de la pareja. Finalmente para algunas parejas es importante conocer la causa de su esterilidad y para otras saber que se ha hecho todo lo posible por conseguir el embarazo, a pesar de que las posibilidades fueran muy reducidas.

Por todo ello se entenderá que la aplicación de unos criterios de racionalización difieran notablemente en virtud de cuales sean los objetivos que se consideren.

Por otra parte debe destacarse que los resultados en reproducción asistida son muy dispares entre los diferentes centros. Así en la estadística de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva algunos centros tienen tasas de embarazo por ciclo triples que las de otros (1). Las tasas de embarazo múltiple también son muy diferentes. Por ejemplo en la encuesta de la ESHRE la tasa de embarazo gemelar en algunos países fueron el doble que en otros, y la de triples casi 40 veces superior en unos países que en otros (2). Del mismo modo, los costes son muy diferentes entre los

diferentes países y sistemas (3), e incluso entre los diferentes centros. Por ello muchas veces no es posible extrapolar adecuadamente los planteamientos terapéuticos realizados en otros contextos al propio medio asistencial. Finalmente no ha de olvidarse que los resultados de las TRA se hallan en continua mejoría, por lo que determinados cálculos pueden resultar erróneos a los pocos años de su realización.

En el presente trabajo, en primer lugar haremos referencia a una serie de publicaciones o meta-análisis que abordan diferentes aspectos de la racionalización terapéutica en medicina reproductiva. Posteriormente consideraremos una serie de intentos racionalizadores que hemos desarrollado en nuestro grupo y que en nuestro medio se han revelado útiles.

EXPERIENCIAS CONSOLIDADAS

1. Costes básicos en reproducción

Como se expone en las Tablas 1 y 2, las diferentes pruebas diagnósticas y los distintos recursos terapéuticos tienen sus costes específicos, y los tratamientos además su específica tasa de éxito (3-5). Todo ello debe ser conocido, con especial referencia a nuestro propio contexto para poder realizar una correcta utilización de los recursos.

2. Conducta en la esterilidad de origen desconocido

Si bien la tasa de embarazo por ciclo es más alta si se hace FIV de entrada que si se hace IAC, desde el punto de vista de la coste-efectividad es más adecuado realizar inicialmente IAC (Tabla 3) (3 y 5).

Tabla 1

Distribución y costes de los servicios de esterilidad en Gran Bretaña. (Tomada de ref 3 y 4)

Servicio	% de parejas que lo requieren	Nº de valoraciones	Coste por pareja	Coste por 100 parejas (ptas)
Valoración por médico de familia	100	1,0	5.677	567.796
Consulta por especialista	82	1,0	6.455	519.733
Visitas sucesivas por especialista	82	1,0	2.202	180.587
Análisis de semen	87	1,6	2.356	204.972
Histerosalpingografía	69	1,0	9.566	660.033
Laparoscopia	63	1,0	93.369	5.882.225
Progesterona plasmática	60	1,5	3.654	219.225
Otros análisis hormonales	49	3,0	11.058	541.880
Biopsia endometrial	34	1,2	8.626	293.322
Coste total				9.069.775

Tabla 2

Resultados y costes de las principales terapias reproductivas en Gran Bretaña (en los tratamientos médicos y las técnicas de reproducción asistida los resultados se expresan por ciclo). (Tomada de ref 3 y 5)

Tipo de esterilidad	Tratamiento	Tasa media de embarazo (%)	Coste esperado de los tratamientos (ptas)
Ovulatoria	Bromocriptina	30	4.681
	Cabergolina	30	10.246
	Citrato de clomifeno	14	926
	Gonadotropinas	14	176.783
	Diatermia ovárica por laparoscopia	40	112.774
	FIV	26	371.916 - 451.042
Tubárica	Cirugía	10-46	135.708 - 351.631
	FIV	15-25	451.663
Endometriosis	Cirugía	5-31	88.631 - 351.631
	FIV	15-25	451.663 - 587.371
Masculina	IAC+EO	15	122.905
	IAD	7,5	69.826
	IAD+EO	20	149.205
	ICSI	31	546.343
Origen desconocido	IAC+EO	20	122.905
	FIV	24	451.663

(EO= estimulación ovárica)

Tabla 3

Resultados del análisis coste - efectividad para esterilidad de origen desconocido (Ref 3 y 5)

	IA- EO	FIV (1 a 4 ciclos)
Coste por pareja (ptas)	413.173	556.245 - 1.192.179
Nº embarazos*	102,4	51,52 - 124,05
Coste por embarazo (ptas)	968.103	2.591.339 - 2.306.510
Coste incremental (ptas)		D - 8.639.024
Los costes incluyen los test diagnósticos . La IA-EO se refiere siempre a 4 ciclos Rangos en el FIV de 1-4 ciclos. * Nº total sobre número específico de ciclos o periodo. D = dominado IA- EO : inseminación artificial con estimulación ovárica		

3. Tratamiento del varón a la luz de la medicina basada en la evidencia

En los diferentes meta-análisis efectuados no se ha demostrado la eficacia de ningún tratamiento médico o quirúrgico realizado sobre el varón estéril, excepción hecha del tratamiento con gonadotropinas del hipogonadismo hipogonadotopo (Tabla 4) (6 y 7)

4. Cirugía frente a FIV en la endometriosis y el factor tubárico

Como se advierte en las Tablas 5 y 6 la FIV es mucho más coste-efectiva que la cirugía en las formas severas(3, 5).

EXPERIENCIAS DESARROLLADAS EN NUESTRA UNIDAD

1. El test FIV pre-IAC

La sistemática de actuación en la IAC en nuestro grupo inicialmente consistía en la realización de 6 ciclos de IAC en estímulo gonadotropínico y monitorización endocrinológica y en las parejas en las que no se conseguía embarazo eran objeto de FIV. Dicha metodología es similar a la realizada por la mayor parte de los grupos dedicados a la reproducción asistida. Sin embargo, en nuestro centro hace tiempo que advertimos cómo entre las pacientes que no conseguían embarazo tras 6 ciclos de IAC existía una importante tasa de fracasos de fertilización cuando poste-

Tabla 4
Meta-análisis del tratamiento de la infertilidad masculina (ref 6)

Procedimiento	Número de estudios	Número de casos	% Consecución de hijo en tratados	% Consecución de hijo en no tratados	Odds ratio	Intervalos de confianza	Significación estadística	Número que es necesario tratar para conseguir un hijo (NNT)
Tratamiento del varicocele	6	385	27,1	25,0	1,08	0,42-1,13	no	47,6
Andrógenos	8	908	14,8	13,9	1,1	0,75-1,61	no	111
Bromocriptina	3	112	5,2	7	0,7	0,15-3,24	no	PRCT
Clomifeno	5	423	15,4	12,5	1,26	0,99-1,56	no	34,5
Kalikreina	7	523	18,3	8,2	2,39	1,43-3,98	si	9,9
Inhibidores de la ACE	1	54	19,2	28,6	0,61	0,18-2,09	no	PRCT
Gonadotropinas	3	223	14,5	10	1,45	0,78-2,70	no	22
Antibióticos	4	187	11,4	6,1	1,87	0,70-4,46	no	19
Tratamiento inmunológico	4	190	DND	DND	2,02	0,88-4,61	no	190
Vitamina E	2	104	17,9	5,1	4,04	1,36-11,96	si	7,8

NNT: numero de pacientes que es necesario tratar
DND: datos no disponibles
PRCT: peores resultados con tratamiento

Tabla 5
Resultados del análisis coste - efectividad para el factor tubárico (ref 3,5)

	LEVE		MODERADO		SEVERO	
	CIRUGIA	FIV (1 a 4 ciclos)	CIRUGIA	FIV (1 a 4 ciclos)	CIRUGIA	FIV (1 a 4 ciclos)
Coste por pareja (ptas)	240.382	556.245-1.176.925	210.663	526.526-1.215.586	426.586	526.526-1.288.437
Nº embarazos*	12,88	6,30-14,96	5,46	7,56-19,09	4,2	5,67-15,23
Coste por embarazo (ptas)	522.318	2.472.200-2.203.151	1.620.606	2.925.875-2.674.184	4.266.123	3.901.079-3.552.341
Coste incremental		D-12.628.734		6.319.101-3.096.299		2.858.021-3.280.662

Los costes incluyen los test diagnósticos.
Rangos en el FIV de 1-4 ciclos .
* Nº total sobre número específico de ciclos o periodo.
D = dominado

Tabla 6
Resultados del análisis coste - efectividad para la endometriosis (ref 3,5)

	LEVE		MODERADA		SEVERA	
	CIRUGIA	FIV (1 a 4 ciclos)	CIRUGIA	FIV (1 a 4 ciclos)	CIRUGIA	FIV (1 a 4 ciclos)
Coste por pareja (ptas)	193.305	556.245 - 1.176.925	456.305	556.245 - 1.245.042	456.305	691.953 - 1.453.864
Nº embarazos*	4,09	3,00 - 7,12	2,67	2,40 - 6,06	0,67	1,80 - 4,84
Coste por embarazo (ptas)	629.359	2.472.200 — 2.203.151	2.280.999	3.090.250 — 2.739.408	9.123.996	5.125.344 — 4.050.200
Coste incremental		D- 4.330.032		D- 3.099.455		2.773.335 — 3.190.190

Los costes incluyen los test diagnósticos.
Rangos en el FIV de 1-4 ciclos.
* Nº total sobre número específico de ciclos o periodo.
D = dominado

riormente eran objeto de FIV (8). El porcentaje de casos con fertilización del 0% fue el 29,6% de todas aquellas en las cuales se obtuvieron 4 ó más ovocitos. Este porcentaje era claramente inferior al 7% de fracaso de fertilización de nuestro programa FIV. A la vista de ello emprendimos una modificación radical en el flujo de las pacientes teóricamente tributarias de IAC. Una vez sentada la indicación de la IAC, las pacientes eran objeto de fertilización in vitro (“test FIV”) diagnóstico- terapéutica. Los resultados con dicho proceder fueron los siguientes: 11,5% de ausencia de fertilización (indicándose por lo tanto ICSI para posteriores tratamientos) y 16% de embarazo en el test FIV .El restante 72,5% pasó pues a IAC.

En el momento de la realización del estudio existía una demora de 12 meses para el inicio de la IAC. En este periodo se embarazaron el 8,9% de las que se hallaban en espera, siendo la tasa de embarazo por ciclo el 0,7% por ciclo. Durante la IAC la tasa de embarazo por ciclo fue del 11,7%. Finalmente, en la secuencia FIV-IAC se consiguió embarazo en el 41,4% de las pacientes, siendo dicha tasa provisional, ya que no todas las pacientes han concluido los 6 ciclos de IAC.

2. La interconversión de los ciclos de TRA

2.a Transformación de un ciclo FIV en IAC en la baja respondedora (con al menos 2 folículos)

Uno de los problemas no resueltos en la FIV-ICSI

es el de la baja respondedora. Si bien no existe consenso respecto a la definición de baja respondedora, la mayoría de los grupos, incluido el nuestro obtienen unos resultados poco alentadores. Así determinados autores recomiendan la cancelación del ciclo, mientras que otros prefieren continuar, a sabiendas del mal pronóstico .

En nuestro centro hemos optado por transformar los ciclos FIV en ciclos de IAC cuando el día de la administración de la HCG se observan de 2 a 4 folículos > (de 14 mm). Cuando se visualizaban 4 folículos el estradiol debía ser inferior a 800 pg/ml. Cuando sólo se apreciaba un folículo, el ciclo era cancelado. Para poder llevarse a cabo la transformación debían de satisfacerse los requisitos seminales y clínicos de indicación de la IAC.

Con dicha sistemática obtuvimos una tasa de embarazo por ciclo convertido del 14,3% (9) , frente al 17,3% obtenido en nuestra unidad en la IAC, globalmente en el mismo periodo de tiempo (Tabla 7) . Se trata de una tasa de embarazo nada desdeñable, en especial en una paciente baja respondedora, que además de esta manera es sometida a un procedimiento menos agresivo y menos costoso. Por ello nosotros recomendamos que los grupos que no tengan buenos resultados con las bajas respondedoras tengan en consideración la posibilidad de transformar el ciclo en una IAC, si se observan de 2 a 4 folículos >14 mm y se cumplen los requisitos para la realización de la IAC.

Tabla 7
Ciclos FIV transformados en IAC (ref 9)

	FIV convertida en IAC (n = 57)	Población general de IAC (n= 1390) (Enero 1996-Dic.2001)
Edad (años)	35,3 ± 3,0	34,3 ± 3,1
Número de folículos ≥16 mm	2,7 ± 0,7 (a)	4,2 ± 1,8
Estradiol el día de la HCG (pg/ml)	765 ± 352 (a)	959 ± 342
Días de estimulación	12,8 ± 2,4 (a)	10,4 ± 2,1
Tasa de embarazo por ciclo (%)	14,0	17,3
Los valores están expresados como medias (desvío estándar a= p < 0.05		

2.c Transformación de un ciclo de IAC con hiperrespuesta en una FIV

La IAC es una técnica “menor” de reproducción asistida, pero que ofrece unas tasas de embarazo muy notables, en especial si se compara con la menor agresividad del procedimiento y su menor coste. Así en diversos estudios se ha puesto de manifiesto que es más coste-efectiva que la FIV en la esterilidad de origen desconocido. En nuestra Unidad la tasa de embarazo por ciclo en IAC durante el año 2001 fue del 19,2%. Sin embargo la IAC conlleva el problema aún no resuelto del embarazo múltiple. En los ciclos con hiperrespuesta, se incrementa sensiblemente la probabilidad de embarazo, pero también la de embarazo múltiple, así como la del embarazo múltiple de alto grado. Por ello en presencia de desarrollo de un elevado número de folículos sobre el cual no existe consenso- se suele recomendar cancelar el ciclo. En nuestra Unidad cuando el día de administración de la HCG se advierten en el control folicular 6 ó mas folículos > 14 mm, optamos por transformar el ciclo en un ciclo de FIV. Hasta comienzos del presente año 2002 dicha conversión contaba con el riesgo de ovulación anticipada (ya que estas pacientes no se encontraban en supresión hipofisaria, y por nuestra organización no podemos realizar punciones foliculares ni sábados ni festivos), por lo que se indicaba con cierto carácter restrictivo. Sin embargo desde que en nuestro país está disponible el agonista de la GnRH, dicha indicación se está llevando a cabo con mayor liberalidad.

En los últimos años hemos realizado 71 ciclos de FIV como transformación de ciclo de IAC. La tasa de embarazo fue del 26,8% por ciclo, no produciéndose

ningún embarazo triple o de superior grado. Nos parece pues que se trata de una alternativa muy razonable en este subgrupo de pacientes con hiperrespuesta en la IAC.

3. Empleo de clomifeno o gonadotropinas en la IAD-IU

Es bien sabido que la estimulación gonadotropínica comporta superiores tasas de embarazo que el clomifeno, pero al mismo tiempo un mayor riesgo de embarazo múltiple. Sin embargo la cuantificación de la relación riesgo (de múltiple)/ beneficio (embarazo) no había sido realizada. En un recientemente concluido estudio prospectivo randomizado encontramos una tasa de embarazo por ciclo del 6,1% en el clomifeno frente a un 14,4% en la FSH, siendo las tasas de múltiple 12,5% y 20%, con una tasa de triples de 0% y 7% (Tabla 8) (10). A la vista de nuestros resultados estimamos que no puede realizarse una recomendación absoluta al respecto, sino que deberá ser la pareja, una vez conocidos dichos datos, quien decida.

4. Realización de 1 ó 2 inseminaciones por ciclo.

No existe consenso sobre la conveniencia de realizar 1 ó 2 inseminaciones por ciclo en la IAC. La bibliografía al respecto es discrepante. En nuestro grupo acaba de efectuarse un meta-análisis sobre el tema (11), que involucraba a 865 pacientes y 1168 ciclos, resultando una tasa de embarazo del 11,6% (62/534) en la población con una inseminación frente a 15,3% en la de dos inseminaciones (95/619). Las diferencias estuvieron próximas a la significación estadística (p= 0,08), siendo la odds ratio de 1,38 (IC de 0,97 a 1,97). A pesar de ello, nosotros continuamos realizando una sola inseminación por ciclo, ya que nuestra tasa de embarazo con una sola inseminación (19,2% en el año 2001) es superior a la obtenida en el meta-análisis con 2 inseminaciones, mientras que la duplicación del trabajo por ciclo al laboratorio de Andrología nos obligaría a reducir sensiblemente el número de ciclos realizados.

CONCLUSIONES

En la bibliografía existen variadas recomendaciones para un empleo más racional de los recursos diagnósticos y terapéuticos en reproducción humana. Sin embargo, su traslado de un contexto asistencial a otro no siempre es posible en virtud de las diferentes características demográficas, económicas, asistenciales

Tabla 8*Comparación de los resultados en la IAD-IU con estimulación ovárica con clomifeno en protocolo fijo o con FSH (10)*

	Clomifeno	FSH	OR	95% CI
Tasa de embarazo por ciclo	6.1 (16/261)	14.4 (30/209)	2.6	1.3-5.1
Tasa de embarazo por ciclo iniciado	6.1 (16/264)	12.6(30/238)	2.2	1.1-4.3
Tasa de embaarzo por mujer	31.4 (16/51)	61.2 (30/49)	3.4	1.4-8.6
Embarazo múltiple	12.5 (2/16)	20 (6/30)	1.7	
Trillizos o mas	0	2/30		
Aborto	31.2 (5/16)	26.7 (8/30)		
Síndrome de hiperestimulación ovárica	0.4 (1 / 261)	1.9 (4 /261)	5.1	0.5-79.8
Ciclos cancelados	1.1 (3/264)	12.2(29/238)	12.1	3.5-32.9

y de resultados, así como de los deseos de las parejas. Por ello resulta obligado que cada centro cuente con sus propios indicadores de proceso para poder tomar las decisiones terapéuticas más pertinentes

BIBLIOGRAFÍA

1. **SART.:**1998 Assisted Reproductive Technology succes rate . National Summary and Fertility Clinics Report.2001; Published. <http://www.cdc.gov/nccdphp/drh/art98/98nation.htm>
2. **Nygren KG, A Nyboe Andersen.:** Assisted reproductive technology in Europe, 1997. Results generated from European registers by ESHRE. Hum Reprod 2001; 16: 384-391
3. **Matorras R, Valladolid A.:** Aspectos económicos de las técnicas de reproducción asistida. Actualizaciones de la Sociedad Española de Fertilidad. Sociedad Española de Fertilidad, 2001; Madrid.
4. **Collins JA, Feeny D, Gunby J.:** The cost of infertility diagnosis and treatment in Canada in 1995. Hum Reprod 1997;12:951-58.
5. **Philips Z , Barraza-Llorens M , Posnett J.:** Evaluation of the relative cost-effectiveness of treatments for infertility in the UK.Hum Reprod 2000; 15: 95- 106
6. **Matorras R.:** El tratamiento del varón a la luz de la medicina basada en la evidencia. Rev Iberoam Fertil (in press) 2002.
7. **Kamischke A, Nieschlag E.:** Analysis of medical treatment of male infertility. Hum Reprod 1999; 14 (supl 1) : 1- 23.
8. **Prieto B, Matorras R, Corcóstegui B, Neyro JL, Mendoza R, Benito A, Rodríguez-Escudero FJ.:** Valoración crítica del test FIV pre IAC. 23 Congreso de la Sociedad Española de Fertilidad 2000; Sevilla, Mayo.
9. **Matorras R, Corcóstegui B, Mendoza R, Ramón O, Uriarte M, Rodríguez- Escudero FJ.:** The conversion of an IVF cycle into IUI is a reasonable option in low responders with at least 2 follicles (submitted for publication)
10. **Matorras R, Diaz T, Corcóstegui B, Ramón O, Pijoan JI, Rodríguez-Escudero FJ.:** Ovarian stimulation with highly purified urinary FSH or clomiphene in intrauterine insemination with donor sperm : a randomized study. (submitted for publication)
11. **Osuna C, Matorras R, Pijoan JI, Corcóstegui B, Rodríguez-Escudero FJ.:** Meta-análisis sobre la utilidad de realizar una o dos inseminaciones por ciclo en la IAC. 24 Congreso de la Sociedad Española de Fertilidad,Palma de Mallorca 2002; May.

La práctica de la reproducción asistida en los hospitales públicos españoles

Romeu A

Servicio de Ginecología (Reproducción Humana). Hospital Universitario La Fe. Valencia

En general, el marco en el que se desarrollan tareas asistenciales condiciona el desarrollo y el resultado de las mismas; la práctica de la reproducción asistida, en particular, no podía ser una excepción. La consecuencia es que el tratamiento de la esterilidad mediante la aplicación de técnicas de reproducción asistida en los hospitales públicos nacionales está fuertemente condicionada por la estructura y funcionalidad de los mismos.

Es obvio que es difícil generalizar y que tan absurdo es hablar de “la medicina privada” en general como de “la medicina pública” si se pretende entrar en detalles porque cada centro, privado o público, presenta peculiaridades que lo caracterizan. No obstante, contando con informaciones recibidas y, fundamentalmente, desde la perspectiva de la experiencia personal, trataré de analizar el marco en que nos movemos quienes dedicamos nuestro trabajo al tratamiento de la esterilidad mediante técnicas de fecundación *in vitro*.

Los hospitales públicos ofrecen algunos aspectos favorables.

Trabajar en un hospital público no implica gastos para el profesional. Efectivamente, el profesional no tiene que invertir dinero para desarrollar su labor puesto que todo le viene dado. Otra cuestión es cómo le viene dado: en general tarde y en ocasiones mal; el profesional participa en la elección del equipamiento pero no en la selección del personal. El equipamiento suele llegar tarde porque los concursos se resuelven, en general, cuando ya se había olvidado la petición; el personal depende de los avatares de los concursos, sean éstos traslados o concursos-oposición.

Pero no deja de ser cierto que el profesional no tiene que realizar desembolsos para trabajar en un centro en el que todo se le suministra. Tampoco tiene que preocuparse por su remuneración económica porque el mes siguiente seguirá cobrando.

Cuando se trabaja en un centro hospitalario público nunca faltan pacientes: el profesional no tiene que preocuparse por la agenda de citas porque siempre está llena. En el caso que nos ocupa, llena para varios años.

Sin embargo, se trata de pacientes que, en general, acuden al centro porque la asistencia es gratuita. Son, habitualmente, pacientes desconfiados, disgustados y hartos de sufrir el sistema. Es difícil encontrar pacientes dispuestos a mantener una buena relación con el profesional y establecerla cuesta un esfuerzo extra.

Vistas así las cosas, aunque se han señalado inconvenientes, el sistema podría llegar a ser bucólico y rodar perfectamente. Sin embargo no es así: nadie está parece estar satisfecho con la situación.

El trabajo en reproducción asistida encaja mal en el hospital público y existen para ello determinadas razones:

– La reproducción asistida se ha introducido en los hospitales públicos con calzador

Tradicionalmente se ha considerado la reproducción una función de lujo -nadie se muere por no tener un hijo- y todavía es así en muchos sectores, incluso entre los profesionales sanitarios. Cuanto más entre los administradores. ¿Estará escrito en el viento, como en la canción de Dylan que se trata de vivir bien y no sólo de vivir?

Aunque se trata de situaciones que ya pertenecen a la historia, en un buen número de casos se ofreció a los profesionales la implantación de la reproducción asistida a cambio de asumir el aborto. Esta estrategia, que conlleva otros problemas, denotaba una falta de convencimiento o de voluntad política para el desarrollo de la reproducción asistida: ésta era un señuelo a olvidar y no un objetivo a alcanzar.

– El régimen laboral no se adapta a las necesidades
Efectivamente, aunque el manejo de la estimulación ovárica se ha hecho más cómodo con la introducción de los análogos de la GnRH, con frecuencia, las

actuaciones tienen que ser programadas en fin de semana o día festivo, lo que implica que el equipo clínico tenga que cancelar el caso o hacer horas extraordinarias que no siempre la administración está dispuesta a pagar.

Estas horas pueden ser trabajadas y no cobradas pero, desde el punto de vista empresarial esta situación es desastrosa porque es obvio que aquello que se da se da cuando se quiere dar y, si se hace así, se crean situaciones que conculcan la ética.

Por lo que respecta al equipo de embriólogos, con frecuencia tienen que prolongar la jornada porque su trabajo, por decirlo de alguna forma, empieza cuando el del clínico termina: es entonces cuando tienen que microinyectar, criopreservar, etc. Tampoco es fácil conseguir que estas horas sean remuneradas.

Todavía hay aspectos más graves. Si un clínico trabaja en día festivo puede conseguir, aunque no será fácil, que se le remunere puesto que el administrador puede aplicar el concepto de guardia. Sin embargo, no está previsto que un biólogo haga guardias y, en este caso, no se le puede pagar salvo que se llegue a establecer una situación especial.

La generosidad de la administración rara vez llega a sobreponerse al habitual espíritu de ahorro que nuestros administradores tienen que hacer convivir en vecindad con los grandes gastos en cuya importancia puede no repararse por razones coyunturales.

– Se han difundido errores que no se han corregido con el tiempo

La reproducción asistida siempre ha llevado la etiqueta de procedimiento caro y esta idea ha sido siempre una útil razón para limitar su desarrollo.

Este es un aspecto importante del problema porque la discusión sobre lo que es caro o no -si es que hay algo que no lo sea- en medicina puede ser eterna, según el enfoque que se le dé.

Sin llegar a ampararme en la conocida frase “la medicina es cara pero la salud no tiene precio”, puede llegar a afirmarse que pocos actos terapéuticos llegan a resolver satisfactoriamente el problema en el 40% de los casos al precio y con la rentabilidad que lo hace (nacidos en esta senescente sociedad) como la reproducción asistida.

– Las técnicas de reproducción asistida han sido siempre mal vistas

Todos aquéllos que, desde cualquier punto de vista ideológico, han creído estar en posesión de la verdad han emitido sus opiniones, en general condenatorias, sobre las técnicas de reproducción asistida: los ortodoxos de la derecha han afirmado que se trata de graves pecados y los ortodoxos de la izquierda han

defendido que se trata de una manipulación más de la mujer.

A pesar de todo, no sin esfuerzo de administrados y administradores, la red de hospitales públicos de este Estado, lenta y paulatinamente, ha desarrollado una labor importante y ha consolidado la aplicación de unas técnicas que, en su mayor parte y en todos los países, están en manos privadas. En este país podemos decir con satisfacción que gratuitamente lo mismo se trasplanta un hígado, que se atiende un parto, que se hace una fecundación in vitro.

Si pasamos revista a lo que han hecho los centros públicos, es necesario señalar:

1. Han consensuado un documento que analiza, fundamenta y pretende racionalizar la aplicación de las técnicas de reproducción asistida en nuestro país. En este documento se delimita las indicaciones, las contraindicaciones y las prioridades, se limita el número de ciclos por paciente y se define las condiciones en que las técnicas de reproducción asistida deben ser aplicadas en pacientes de riesgo.

2. Han alcanzado un volumen de actividad no despreciable con resultados aceptables. Esta actividad ha sido recientemente recogida por el Dr. Matorras en una encuesta contestada por la totalidad de centros públicos españoles que practican la fecundación in vitro; conviene por lo tanto señalar que los datos relativos a inseminación artificial no reflejan la totalidad de los ciclos de inseminación practicados en España. El número de ciclos de fecundación in vitro (clásica y microinyección) practicado en España en el año 2.000, en total y clasificado según las distintas comunidades autónomas, se recoge en la figura 1. Si se representa estos ciclos por millón de habitantes, se obtiene el resultado recogido en la figura 2.

3. Evidentemente, habiendo consolidado cuanto se ha citado, han sentado las bases de un desarrollo sostenible, tanto desde el punto de vista científico como social, si la administración alcanza a manejarlo convenientemente.

Me consta que los profesionales de los centros públicos están bien dispuestos a mejorar la eficacia del sistema. Por otra parte, durante los últimos tiempos, la situación ha ido paulatinamente mejorando y se reciben desde la administración noticias no confirmadas de que van a ser introducidos algunos cambios que supondrán nuevas mejoras que, lógicamente, deben traducirse en un aumento de la satisfacción de profesionales y usuarios del sistema público de salud.

En definitiva, la medicina reproductiva en los centros públicos españoles es como esa botella medio llena por lo logrado y medio vacía por las carencias. En las manos de todos está llenarla.

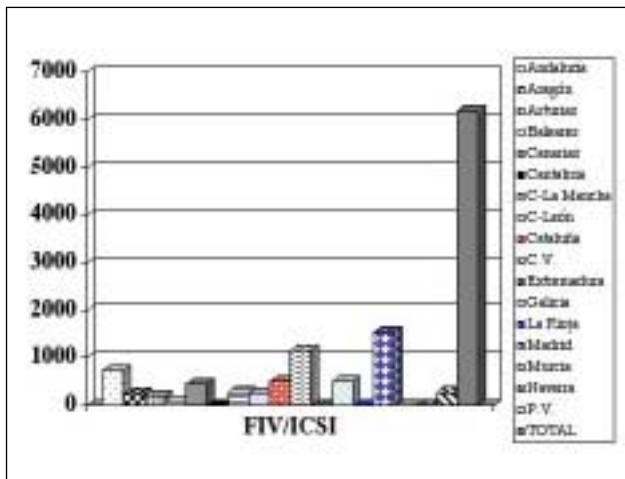


Figura 1

Número de ciclos de fecundación in vitro realizados en España. (total y referidos a las CC AA)

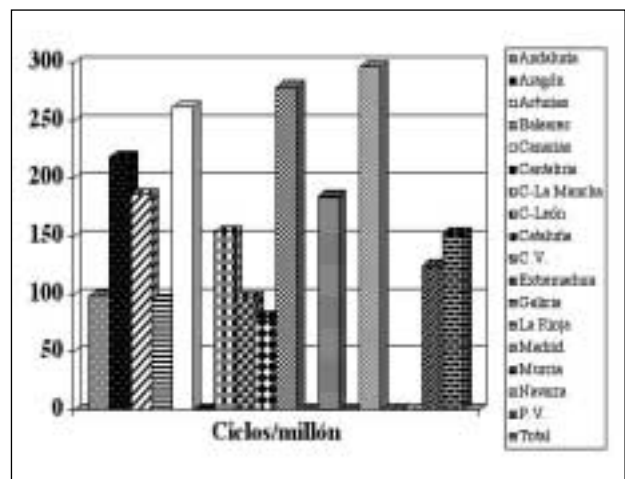


Figura 2

Número de ciclos por millón de habitantes en las distintas CC AA y en el total del Estado.

¿Estamos progresando en los diagnósticos clínico y fisiopatológico de los defectos de los espermatozoos?

Oehninger S MD

Professor, Departments of Obstetrics & Gynecology and Urology. Director, Division of Reproductive Endocrinology and Infertility. The Jones Institute for Reproductive Medicine. Eastern Virginia Medical School. USA

RESUMEN

Las anomalías en los espermatozoos son la causa identificable más frecuente del fracaso reproductor en la especie humana. Aunque se han hecho considerables progresos, se necesita trabajar más para conseguir objetividad y la normalización de algunos de los métodos de diagnóstico andrológicos utilizados en el marco clínico. Se necesita más información para desenmarañar la fisiología de los espermatozoides y la biología de la interacción entre gametos humanos y para determinar de forma definitiva qué pruebas son los pronosticadores más exactos del estado funcional de los espermatozoides y cómo se correlacionan con un posible embarazo después de intervenciones in vivo e in vitro. Los hombres estériles se pueden tratar con éxito con terapias urológicas y médicas determinadas o con tecnologías de reproducción asistida (TRA). Entre estas últimas, la inyección intracitoplásmica de espermatozoides (IICE) se ha convertido en un método validado para superar muchas de las deficiencias de los espermatozoides. No obstante, es de esperar que se desarrollen modalidades terapéuticas sencillas y más rentables a medida que se adquiera más conocimiento básico (celular y molecular) y clínico.

INTRODUCCIÓN

Aunque los problemas de diagnóstico hacen difícil determinar con exactitud el grado de contribución del varón en la pareja, existen varios estudios que sugieren que los problemas del varón representan la causa simple definida más frecuente de infertilidad. Los trastornos relacionados con el varón probablemente

representan hasta un 40-50% de las parejas sin hijos, solos o en combinación con factores femeninos. (1-7)

Las opciones de tratamiento para la infertilidad masculina incluyen diversos procedimientos urológicos (quirúrgicos y no quirúrgicos), intervenciones médico-farmacológicas, procedimientos de reproducción asistida poco complicados, (tal como la terapia de inseminación intrauterina o IIU) y las tecnologías de reproducción asistida (TRA) más avanzadas y complejas. Entre estas últimas, la fertilización in vitro (FIV) y la transferencia embrionaria, potenciada con la inyección intracitoplásmica de espermatozoides (IICE) en casos moderados y graves, constituyen formas validadas y eficaces de favorecer la fertilización y la concepción. En estadísticas nacionales de EE.UU., (8) se describió una incidencia del 40% de IICE en 61.650 ciclos de FIV realizados en el período de un año, una cifra que resalta la importancia de esta técnica.

No obstante, a pesar de que las terapias actuales han potenciado las oportunidades para concebir en parejas que sufren infertilidad masculina, a menudo estas soluciones se sacan a relucir sin que haya un diagnóstico etiológico o fisiopatológico definido. La infertilidad masculina, por desgracia, todavía se considera "idiopática" en una elevada proporción de casos.

ANÁLISIS DEL SEMEN

La piedra angular de la evaluación andrológica en todos los casos es una anamnesis exhaustiva y un reconocimiento médico seguido de análisis repetidos de semen. Según las necesidades deberán ponerse en práctica procedimientos urológicos, endocrinos y/o de

diagnóstico por imágenes. Es fundamental un análisis de semen completo siguiendo las directrices de la Organización Mundial de la salud (OMS) (9) al nivel de atención primaria para hacer un diagnóstico inicial racional y elegir el tratamiento clínico apropiado. La recogida y análisis del semen deberá realizarse por procedimientos debidamente normalizados en laboratorios debidamente cualificados y acreditados (10).

La evaluación "básica" de semen deberá incluir: (1) evaluación de las características físicas del semen (volumen, licuefacción, aspecto, consistencia, pH y aglutinación); (2) valoración de la concentración de espermatozoides, graduación de la motilidad y análisis de características morfológicas (empleando criterios estrictos) (11); (3) determinación de la vitalidad de los espermatozoides (viabilidad), comprobación de auto-anticuerpos en los espermatozoides (utilizando las pruebas mixtas de reacción de antiglobulina y/o pruebas inmunológicas directas sobre cuentas), presencia de leucospermia y de células espermáticas inmaduras; y (4) estudios bacteriológicos. La identificación y separación de la fracción de espermatozoides con motilidad es también una parte integral de la evaluación inicial del semen (12,13).

PRUEBAS FUNCIONALES DE LOS ESPERMATOZOIDES

Otras clases de ensayos que se consideran habitualmente comprenden: (1) pruebas que examinan indirectamente funciones defectuosas de los espermatozoides mediante el uso de pruebas bioquímicas (como la medida de la generación de especies reactivas a oxígeno o evidencia de daño peroxidativo, medida de actividades enzimáticas tal como la creatina fosfoquinasa y otras); (2) bioensayos de interacción entre gametos (como la prueba de oocitos de hámster libres de la zona heteróloga y los ensayos de fijación de espermatozoides homólogos-zona pelúcida) y puntuación de la reacción de acrosoma inducida; y (3) análisis del movimiento de los espermatozoides asistido por ordenador (AMEO) para evaluar las características del movimiento de los espermatozoides (14-26).

Hemos publicado recientemente los resultados de un metaanálisis que pretendía determinar la exactitud de las pruebas diagnósticas y el valor pronóstico de varios ensayos de la función de los espermatozoides para el resultado de la FIV (23). Las pruebas examinadas fueron el AMEO, comprobación de la reacción del acrosoma, prueba de penetración de huevos de hámster libre de zona o ensayo de penetración de los espermatozoides (EPE) y ensayos de fijación de es-

permatozoides-zona pelúcida. La validez de tales ensayos se evaluó objetivamente mediante los resultados obtenidos de 2.906 individuos evaluados en 34 estudios controlados con diseño prospectivo. Los resultados demostraron un elevado poder pronóstico de los ensayos de fijación espermatozoides-zona pelúcida y de reacción inducida del acrosoma para el resultado de la fertilización. Por otra parte, los descubrimientos realizados indicaron el escaso valor clínico del EPE como pronosticador de la fertilización y una necesidad real de normalización y de más investigación de la utilidad clínica potencial de los sistemas de AMEO (23).

La interacción entre los espermatozoos y la zona pelúcida es un acontecimiento decisivo que da lugar a la fertilización y constituye un reflejo de muchas funciones de los espermatozoides (a saber, conclusión de la capacitación, manifestada por la capacidad para fijarse a la zona pelúcida y experimentar la reacción del acrosoma inducida por ligandos) (24-26). Las dos pruebas más frecuentes de fijación de espermatozoides a la zona pelúcida utilizadas actualmente son el análisis de hemizona (AHZ) (14) y un análisis competitivo de fijación de la zona intacta (15). El elevado valor pronóstico tanto positivo como negativo y, lo que es más importante, el bajo índice de falsos negativos (es decir, una sólida capacidad para identificar a pacientes con alto riesgo de fracaso de la fertilización) resalta la capacidad pronóstica de estas pruebas.

Los ensayos de reacción inducida del acrosoma parecen ser igualmente predictivos del resultado de la fertilización y tienen una metodología más sencilla. El uso de un ionóforo de calcio para inducir la reacción del acrosoma es en este momento la metodología más extensamente utilizada (27,28). No obstante, la puesta en práctica de análisis que utilicen volúmenes menores de zonas pelúcidas humanas solubilizadas, ZP3 humano recombinante biológicamente activo o péptidos ZP3 sintéticos activos (o análogos) probablemente permitiría el diseño de ensayos mejores y fisiológicamente orientados de reacción del acrosoma (29-34).

PRUEBAS GENÉTICAS Y DE ADN

Es bien sabido actualmente que ciertos trastornos genéticos están relacionados con infertilidad masculina, algunos de ellos potencialmente transmisibles a los hijos (35). Las anomalías cromosómicas (estructurales y numéricas que implican cromosomas autosómicos y sexuales) se pueden diagnosticar mediante la realización del cariotipo periférico y se deben estudiar en varones con oligozoospermia severa y azoos-

permia no obstructiva (36-38). A nivel de genes, el fallo reproductivo puede estar relacionado con mutaciones de fibrosis quística (en hombres con azoospermia obstructiva debida a la ausencia congénita de los vasos deferentes) y con microdeleciones de Y (en hombres con oligozoospermia severa y azoospermia no obstructiva debido a fallo en la espermatogénesis) (39-41). Tales anomalías también se pueden detectar mediante análisis de sangre periférica empleando metodologías PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (PCR convencional, nidificada, multiplex, fluorescente o cuantitativa) (35).

También se ha demostrado que los espermatozoos de los hombres estériles contienen diversas alteraciones nucleares. Algunos incluyen una estructura anormal de la cromatina, aneuploidía, microdeleciones cromosómicas y roturas de la cadena de ADN (42-52). Se han propuesto distintas teorías para explicar el origen del daño del ADN en los espermatozoos. El deterioro se podría producir en el momento, o como resultado, del empaquetamiento de ADN durante la transición de histona a complejo protamina durante la espermiogénesis. La fragmentación del ADN también podría ser la consecuencia de un daño oxidativo directo (el deterioro de ADN inducido por radicales libres se ha relacionado con depleción de antioxidante, consumo de tabaco, xenobiótica, exposición al calor, contaminación del semen por leucocitos y presencia de iones en los medios de cultivo de los espermatozoides). Por otra parte, el deterioro del ADN podría ser consecuencia de una apoptosis.

En la actualidad existen varias pruebas para la detección de algunas de esas anomalías, entre las que se incluye la tinción con azul de anilina (51) naranja de acridina (52), análisis de la estructura de la cromatina del espermatozoide (AECE), (47) y evaluación del deterioro o fragmentación del ADN (46,48,50). Dadas las aberraciones de novo que se producen en el momento de la espermatogénesis, algunos hombres estériles tienen lesiones cromosómicas/genéticas en sus espermatozoos que no se encuentran mediante análisis periféricos. El análisis de espermatozoides por FISH ha demostrado una elevada incidencia de alteraciones cromosómicas en los espermatozoos eyaculados en hombres con oligo-asteno-teratozoospermia severa en comparación con hombres fértiles (49).

CÓMO SE DEBE TRATAR AL HOMBRE ESTÉRIL

Los médicos y los científicos siguen buscando los umbrales en los parámetros del semen que se encuen-

tren en las denominadas “poblaciones fértiles normales” con el fin de poder definir con mayor precisión la fertilidad, la subfertilidad y la infertilidad. En publicaciones recientes se han vuelto a estudiar debidamente estos temas tanto en estudios europeos como americanos (53, 54).

Si las anomalías en los espermatozoides se observan en el análisis “básico” de semen o si se ha diagnosticado a la pareja como aquejada de infertilidad “no explicada”, lo que procede a continuación es el análisis de la función y bioquímica de los espermatozoides. El diagnóstico de la subfertilidad o infertilidad, basado en las pruebas de detección del primer nivel (evaluación “básica” inicial) y “ampliadas” (funcionales/bioquímicas), enfocará el tratamiento hacia diversas opciones terapéuticas (55-57). Anteriormente propusimos que la evaluación de la cantidad/calidad de los espermatozoides en el laboratorio para la reproducción asistida debería afrontarse utilizando dicho esquema de diagnóstico secuencial de pasos múltiples (55). Este concepto también ha sido propuesto por otros (58).

En este momento es cuando las pruebas de función y bioquímicas de los espermatozoides pueden tener una mayor utilidad para dirigir a la pareja a las TRA. La reproducción asistida puede estar indicada como resultado de: (a) fracaso de tratamientos urológicos/médicos, (b) diagnóstico de intertilidad “no explicada” en la pareja; (c) presencia de anomalías “básicas” en los espermatozoides de grado moderado-alto; o (d) anomalías de la función de los espermatozoides diagnosticadas por bioensayos predictivos (tal como AHZ o la prueba de reacción del acrosoma inducida).

Las opciones recomendadas actualmente en TRA incluyen: terapia de inseminación intrauterina (IIU) de “baja complejidad”, FIV “estándar” seguido de transferencia embrionaria y FIV potenciada con IICE. Si la mujer tiene menos de 35 años, se recomiendan normalmente 4-6 ciclos de inseminaciones intrauterinas (IIU) con espermatozoides del marido como un método sencillo de TRA (baja complejidad).

En nuestro programa, se seleccionan los pacientes para FIV potenciada con IICE según las siguientes indicaciones: [1] parámetros de mala calidad del espermatozoos (esto es, $<1,5 \times 10^6$ espermatozoos en total con motilidad progresiva adecuada después de separación, teratozoospermia severa con $<4\%$ de formas normales en presencia de una fracción con motilidad total en el límite o baja y/o baja capacidad de fijación de espermatozoides-zona pelúcida con un índice de análisis de hemizona $<30\%$); [2] fracaso de la terapia de IIU en casos que presenten parámetros anormales del espermatozoos incluida la presencia de anticuer-

pos antiesperma); [3] fracaso de fertilizaciones previas en FIV; y [4] presencia de azoospermia obstructiva o no obstructiva, en cuyo caso se combina la IICE con la extracción del esperma de los testículos o del epidídimo.

En casos de oligo-asteno-teratozoospermia severa o si el resultado de las pruebas de función de espermatozoides indica un deterioro importante de la capacidad fertilizante, las parejas deben ser dirigidas inmediatamente a IICE. Este método es probablemente más rentable y evitará pérdidas de un tiempo valioso (en particular en mujeres de más de 35 años). Los resultados de IICE empleando esperma eyaculado, del epidídimo (utilizando aspiración microquirúrgica de espermatozoides del epidídimo o AMEE) y de los testículos (utilizando extracción de espermatozoides de los testículos o EET) realizado en varios programas en todo el mundo, son excelentes, parecidos a los resultados de la FIV en poblaciones controladas. Dicho método ha permitido el tratamiento de hombres con azoospermia no obstructiva con síndrome de sólo células de Sertoli, interrupción de la maduración parcial, hipoespermatogénesis y otros cuadros patológicos.

¿QUÉ DEFECTOS DE LOS ESPERMATOZOIDEOS ESTAMOS TRATANDO CON LA IICE?

Hay muchas etapas en las que factores de los espermatozoos y de la interacción de espermatozoides-oocitos se pueden manifestar como fracaso de la fertilización. Por desgracia no se dispone fácilmente de pruebas específicas en la clínica para diagnosticar todos los defectos potenciales. Las anomalías de la concentración de espermatozoides, motilidad y morfología (evaluados mediante criterios estrictos) están relacionadas con una fertilización escasa en la FIV. La presencia de anticuerpos antiesperma y un bajo índice de recuperación después de la separación de la fracción de esperma con motilidad también identifica casos de riesgo para el fracaso de la fertilización. La presencia de "inmadurez" de los espermatozoides (21) y las lesiones como consecuencia de una generación excesiva de especies reactivas a oxígeno (16,17) están documentadas como determinantes de algunos casos de infertilidad masculina. Lo cierto es que, en muchos casos, la infertilidad masculina todavía se considera "idiopática". Se necesita por lo tanto avanzar mucho para determinar si las diversas presentaciones clínicas de oligo-asteno-teratozoospermia (i) son consecuencia de lesiones genéticas, toxinas am-

bientales o disfunciones local-paracrina y (ii) si son el resultado de aberraciones de los procesos testiculares de mitosis, meiosis, espermiogénesis o espermiación, o son por el contrario, de origen posttesticular.

Aparte de la frecuencia y la importancia de los defectos de interacción de espermatozoide-zona pelúcida (fijación y reacción del acrosoma), la evidencia clínica también apunta a otros pasos potencialmente alterados. Las anomalías de capacitación pueden hacer a los espermatozoides incapaces de llegar a ser hiperactivados o de tener una interacción válida con la zona (59-61). Los defectos posteriores a la zona pelúcida incluyen alteraciones de la fusión espermatozoide-oolema, fallo de la activación del oocito por el espermatozoide fertilizante quizás debido a la ausencia o las disfunciones del factor activador del oocito putativo, fallo en la descondensación de la cabeza del espermatozoide y/o formación pronuclear anormal (62,63).

Es obvio que hay un extenso intercambio entre el espermatozoos y el oocito. Además de los efectos que son consecuencia de la fusión de las membranas y la liberación de factores activadores del oocito por el espermatozoos, el oocito utiliza moléculas que inducen la descondensación de la cabeza del espermatozoide (factor de crecimiento del pronúcleo masculino) y la sustitución de protaminas por histonas (64). Los avances en la obtención de imágenes fluorescentes por microscopía confocal de barrido de láser y otras técnicas nuevas permiten hacer un examen sofisticado de alta resolución de gametos y embriones. Hay pruebas recientes obtenidas en el marco de la IICE que demuestran que hay anomalías posteriores a la fusión de los gametos que están relacionadas a veces con casos de fertilización frustrada. Tales problemas incluyen, aunque probablemente no se limitan a ello, el centrosoma del espermatozoide (65) y la mitocondria paterna (66,67), el centro organizador del microtúbulo del oocito y la distribución mitocondrial y la iniciación de la segmentación del embrión (68-71).

La IICE puentea las anomalías de los espermatozoides relacionadas con una concentración insuficiente de espermatozoides, necesaria para lograr la fertilización in vitro (oligozoospermia). Es un remedio cuando existen defectos de motilidad (astenozoospermia debida a deficiencias estructurales o funcionales) ya que supera las disfunciones relacionadas con el gameto masculino incluida la migración y la penetración de la zona. La IICE da lugar a fertilizaciones con éxito en varones con mala morfología (teratozoospermia de diversos tipos); aquellos casos típicamente relacionados con disfunciones de la membrana del es-

permatozoide y/o compartimentos del acrosoma que dan lugar a una interacción insuficiente con la zona pelúcida y/o el oolema. La IICE es de utilidad cuando existen anticuerpos antiesperma tal vez al impedir sus efectos negativos en la motilidad y las interacciones membrana-oocito. No sabemos si la IICE salva los defectos de capacitación cuando se utilizan espermatozoos eyaculados. Aún cuando los espermatozoos del epidídimo e incluso testiculares (morfológicamente maduros) fertilicen con éxito en la fertilización asistida por microcirugía, ¿están tales espermatozoos suficientemente capacitados? ¿Tiene éxito la IICE cuando existen ciertos grados de "inmadurez" de los compartimentos membrana-citoplásmica-nuclear?

Es tentador hacer conjeturas sobre si la IICE salva la mayor parte de las lesiones o disfunciones de los espermatozoides (y sus respectivas causas celulares/moleculares) lo que se traduce en un fallo de la fertilización debido a interacciones inadecuadas con la zona pelúcida (fijación, inducción de la reacción del acrosoma y penetración), fijación y fusión con el oolema e incluso una liberación insuficiente del factor activador del oocito putativo. Por el contrario, es poco probable que la IICE sea útil en casos en que el fracaso de la fertilización esté asociado con alteraciones del núcleo del espermatozoide (cromatina o ADN), en que el espermatozoo no consigue la condensación de la cabeza o es incapaz de formar el pronúcleo masculino o cuando existen anomalías del centrosoma.

A nivel del oocito, podemos suponer que la IICE podría permitir que se produjese la fertilización cuando existen deficiencias aisladas de la zona pelúcida. Esto puede incluir anomalías estructurales (acondicionamiento desorganizado o escaso de los microfilamentos de la zona o una estructura proteica anormal) o funcionales (función deficiente del ligando) de las diversas glucoproteínas de la zona pelúcida. Además la IICE podría salvar deficiencias aisladas del oolema. Sin embargo, es sabido que las anomalías de la zona pelúcida, en particular las de origen genético, están asociadas con anomalías del desarrollo del folículo/oocito más severas (72) y en tales casos la IICE probablemente sería infructuosa. Es dudosa la utilidad de la IICE en casos de aneuploidía del oocito o deterioro del ADN, o cuando existen aberraciones citoplásmicas severas (ya sean estructurales o funcionales) que den lugar a fallos de los procesos de activación del oocito, formación del pronúcleo femenino y divisiones de la segmentación inicial (73). Dado que la expresión del genoma masculino se produce en la fase celular 4 a 8 (74) y puesto que las disfunciones del oocito también se pueden expresar después de la fertilización, la medida de resulta-

dos más adecuada para determinar el éxito de la IICE deberá ser el desarrollo del embrión incluida la aptitud para la implantación.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Hull MGR, Glazener CMA, Kelly NJ.:** Population study of causes, treatment and outcome of infertility. *Br Med J.* 1985;291:1693-1697.
2. **Mosher WD, Pratt WF.:** Fecundity and Infertility in the United States, 1965-1988. *Advance Data from Vital and Health Statistics.* DHHA publication no. (PHS) 91-1250. Hyattsville, MD: Public Health Service 1990
3. **Wilcox LS, Mosher WD.:** Use of infertility services in the United States. *Obstet Gynecol.* 1993;82:122-127.
4. **Bhasin S, De Kretser D, Baker HWG.:** Pathophysiology and natural history of male infertility. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 79:1525-1529.
5. **Society for Assisted Reproductive Technology /American Society for Reproductive Medicine.** Assisted reproductive technology in the United States and Canada: 1993 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry. *Fertil Steril.* 1995; 64:13-21.
6. **Centers for Disease Control and Prevention.** Fertility, Family Planning and Women's Health: New Data from the 1995 National Survey of Family Growth. US Department of Health and Human Services, USA;1997:1-11.
7. **Irvine DS.:** Epidemiology and etiology of male infertility. *Hum Reprod.* 1998; 13(Suppl 1):33-44.
8. **Center for Disease Control and Prevention.** Reproduction Technology Success Rates. National summary and Fertility Clinic reports. U.S. Department of Health and Human Services, 1998: 9-32.
9. **World Health Organization.** WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press; 1999: 4-33.
10. **De Jonge C.:** Commentary: Forging a partnership between total quality management and the andrology laboratory. *J Androl.* 2000; 21:203-205.
11. **Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH, et al.:** Sperm morphologic features as a prognostic factor in in-vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1986; 46:1118-1123.
12. **Oehninger S.:** An update on laboratory assessment of male fertility. *Hum Reprod*1995; 10(Suppl.1), 38-45.
13. **Mortimer D.:** Sperm preparation methods. *J Androl.* 2000; 21:357-366.
14. **Burkman LJ, Coddington CC, Franken DR, et al.:** The hemizona assay (HZA): development of a diag-

- nostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential. *Fertil Steril.* 1988; 49:688-697.
15. **Liu DY, Lopata A, Johnston WIH, Baker HW Gordon, Ph.D.:** A human sperm-zona pellucida binding test using oocytes that failed to fertilize in vitro. *Fertil Steril.* 1988; 50:782-788.
 16. **Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S.:** Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol Reprod.* 1989a; 41:183-187.
 17. **Aitken RJ, Clarkson JS, Hargreave TB, et al.:** Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. *J Androl.* 1989b; 10:214-220.
 18. **Aitken RJ, Irvine DS, Wu FC.:** Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am J Obstet Gynecol.* 1991; 164:542-551.
 19. **World Health Organization.** WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 3rd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1992: 23-26.
 20. **Huszar G, Vigue L, Morshedi M.:** Sperm creatine phosphokinase M-isoform ratios and fertilizing potential of men: a blinded study of 84 couples treated with in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1992; 57:882-888.
 21. **Huszar G, Vigue L.:** Correlation between the rate of lipid peroxidation and cellular maturity as measured by creatine kinase activity in human spermatozoa. *J Androl.* 1994; 15:71-77.
 22. **ESHRE Andrology Special Interest Group (1996)** Consensus Workshop on Advanced Diagnostic Andrology Techniques. *Hum Reprod.* 1996; 11:1463-1479.
 23. **Oehninger S, Franken DR, Sayed E, Barroso G, Kolm P.:** Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy: a meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2000; 6:160-168.
 24. **Oehninger S, Toner JP, Muasher SJ, Coddington CC, Acosta AA, Hodgen GD.:** Prediction of fertilization in vitro with human gametes: Is there a litmus test? *Am J Obstet Gynecol.* 1992a; 167:1760-1767.
 25. **Oehninger S, Franken D, Alexander N, Hodgen G.:** Hemizona assay and its impact on the identification and treatment of human sperm dysfunctions. *Andrologia.* 1992b; 24:307-321.
 26. **Liu DY, Baker HWG.:** Tests of human sperm function and fertilization in vitro. *Fertil Steril.* 1992; 58:465-483.
 27. **Tesarik J.:** Appropriate timing of the acrosome reaction is a major requirement for the fertilizing spermatozoon. *Hum Reprod.* 1989; 4:957-961.
 28. **Cummins JM, Pember SM, Jequier AM, et al.:** A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. Relationship to fertility and other seminal parameters. *J Androl.* 1991; 12:98-103.
 29. **Franken DR, Morales PJ, Habenicht UF.:** Inhibition of G protein in human sperm and its influence on acrosome reaction and zona pellucida binding. *Fertil Steril.* 1996; 66:1009-1011.
 30. **Franken DR, Bastiaan HS, Oehninger S.:** Physiological induction of the acrosome reaction in human sperm: Validation of a micro assay using minimal volumes of solubilized, homologous zona pellucida. *J Assist Reprod Genet.* 2000; 17:156-160.
 31. **van Duin M, Polman J, De Breet IT.:** Recombinant human zona pellucida protein ZP3 produced by Chinese Hamster Ovary cells induces the human sperm acrosome reaction and promotes sperm-egg fusion. *Biol Reprod.* 1994; 51: 607-617
 32. **Chapman NR, Barratt CLR.:** The role of carbohydrate in sperm-ZP3 adhesion. *Mol Hum Reprod.* 1996; 2:767-774.
 33. **Dong KW, Chi TF, Juan YW, et al.:** Characterization of the biological activities of a recombinant human zona pellucida protein 3 (ZP3) expressed in human ovarian (PA-1) cells. *Am J Obstet Gynecol.* 2001; 184:835-44
 34. **Hinsch E, Oehninger S, Hinsch K.:** ZP3-6 peptide and acrosome reaction. Semen evaluation, testing and selection: a new look in the 2000s. In *Andrology in the Nineties Precongress Training Course.* Genk, Belgium: April 22, 1998:25-30.
 35. **St John JC.:** Incorporating molecular screening techniques into the modern andrology laboratory. *J Androl.* 1999; 20:692-701.
 36. **Chandley AC.:** Chromosome anomalies and Y chromosome microdeletions as causal factors in male infertility. *Hum Reprod.* 1998a; 13 (Suppl 1):45-50.
 37. **Chandley AC.:** Genetic contribution to male infertility. *Hum Reprod.* 1998b; 13(Suppl 3):76-83.
 38. **Martin RH.:** Genetics of human sperm. *J Assist Reprod Genet.* 1998; 15:240-245.
 39. **Wong PY.:** CFTR gene and male fertility. *Mol Hum Reprod.* 1998; 4:107-110.
 40. **Vogt PH.:** Human chromosome deletions in Yq11 AZF candidate genes and male infertility: history and update. *Mol Hum Reprod.* 1998; 4:739-744.
 41. **In't Veld P, Brandenburg H, Verhoeff A, et al.:** Sex chromosomal abnormalities and intracytoplasmic sperm injection. *Lancet.* 1995; 346:773.
 42. **Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Thompson W.:** Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res.* 1993; 207:202-205.
 43. **Hughes CM, Lewis SEM, McKelvey-Martin VJ,**

- Thompson W.:** A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men using a modified comet assay. *Mol Hum Reprod.* 1996; 2:613-619.
44. **Lopes S, Jurisicova A, Sun J-G, et al.:** Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 1998; 13:896-900.
 45. **Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, et al.:** Underprotamination and nicking of DNA in ejaculated human spermatozoa are highly related phenomena. *Biol Reprod.* 1995; 52:864-867.
 46. **Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, et al.:** Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod.* 1998; 59:1037-1046.
 47. **Evenson DP, Jost LK, Marshall D, et al.:** Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod.* 1999; 14:1039-1049.
 48. **Sakkas D, Mariechoz E, Manicardi G, et al.:** Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod.* 1999; 4:31-37.
 49. **Pfeffer J, Pang M-G, Hoegerman SF.:** Aneuploidy frequencies in pellet and swim-up semen fractions from ten oligoasthenoteratozoospermic patients donating sperm for intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Fertil Steril.* 1999; 72:472-478.
 50. **Barroso G, Morshedi M, Oehninger S.:** Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2000; 15:1338-1345.
 51. **Hoffman N, Hilscher B.:** Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. *Hum Reprod.* 1991; 6:979-982.
 52. **Tejada RI, Mitchell JC, Norman A et al.:** A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril.* 1984; 42:87-91
 53. **Ombelet W, Bosmans E, Janssen M, et al.:** Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in interpretation of semen testing. *Hum Reprod.* 1997; 12:987-993.
 54. **Zinaman MJ, Brown CC, Selevan SG, Clegg ED.:** Semen quality and human fertility: A prospective study with healthy couples. *J Androl.* 2000; 21:145-153
 55. **Oehninger S, Acosta AA, Veeck L.:** Recurrent failure of in vitro fertilization: role of the hemizona assay (HZA) in the sequential diagnosis of specific sperm/oocyte defects. *Am J Obstet Gynecol.* 1991; 164:1210-1215.
 56. **Oehninger S, Franken D, Kruger T.:** Approaching the next millennium: how should we manage andrology diagnosis in the intracytoplasmic sperm injection era? *Fertil Steril.* 1997a; 67:434-436.
 57. **Oehninger S, Mahony M, Özgür K, Kolm P, Kruger T, Franken D.:** Clinical significance of human sperm-zona pellucida binding. *Fertil Steril.* 1997b; 67:1121-1127.
 58. **Amann RP, Hammerstedt RH.:** In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl.* 1993; 14:397-406.
 59. **Visconti PE, Kopf GS.:** Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod.* 1998; 59, 1-6.
 60. **Florman HM, Arnoult C, Kazam I, et al.:** A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biol Reprod.* 1998; 59, 12-16.
 61. **Ho HC, Suarez SS.:** Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction*, 122, 519-526. Fissore RA, Reis MM, Palermo GD, (1999) Isolation of the Ca²⁺ releasing component(s) of mammalian sperm extracts: the search continues. *Mol Hum Reprod*, 2001; 5, 189-192.
 62. **Fissore RA, Reis MM, Palermo GD.:** Isolation of the Ca²⁺ releasing component(s) of mammalian sperm extracts: the search continues. *Mol Hum Reprod*, 1999; 5, 189-192.
 63. **Rawe VY, Galaverna GD, Nodar FN, et al.:** Cellular events during fertilization failure in humans. *Fertil Steril*, 2001; 76, 375-376.
 64. **Yanagimachi R.:** Mammalian fertilization. In Knobil N, Neill JD, eds. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1994; 189-317.
 65. **Moomjy M, Colombero LT, Veeck LL.:** Sperm integrity is critical for normal mitotic division and early embryonic development. *Mol Human Reprod*, 1999; 5, 836-844.
 66. **Cummins JM.:** Fertilization and elimination of the paternal mitochondrial genome. *Hum Reprod*, 2000; 15, 92-101
 67. **St. John J, Sakkas D, Dimitriadi K, et al.:** Failure of elimination of paternal mitochondrial DNA in abnormal embryos. *Lancet*, 2000; 355, 200.
 68. **Schatten G.:** The centrosome and its mode of inheritance: the reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. *Dev Biol*, 1994; 165, 299-335
 69. **Hewitson L, Simerly C, Dominko T, et al.:** Cellular and molecular events after in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, 2000; 53, 65-104.
 70. **Van Blerkom J, Davis P, Alexander S.:** A microscopic and biochemical study of fragmentation phenotypes in stage-appropriate human embryos. *Hum Reprod*, 2001; 16, 719-729.
 71. **Van Blerkom J, Davis P, Alexander S.:** Differential mi-

tochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence. *Hum Reprod*, 2000; 15, 2621-2633.

72. **Greenhouse S, Rankin T, Dean J.:** Genetic cause of female infertility: targeted mutagenesis in mice. *Am J Hum Genet*, 1998; 62, 1282-1287.
73. **Oehninger S.:** Place of intracytoplasmic sperm injection in management of male infertility. *Lancet*, 2001; 357, 2068-69
74. **Braude P, Bolton V and Moore S.:** Human gene expression first occurs between the four and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature (London)*, 1988; 61, 332-459.