

Análisis de 9 cromosomas en 1er Corpúsculo Polar para la detección de aneuploidias

Pujol A ^{1,2}, Boiso ^{1,2}, Benet J ¹, Veiga A ², Durban M ¹, Egozcue J ¹, Navarro J ¹

1 Unitat de Biologia. Facultat de Medicina. UAB. Bellaterra. Barcelona.

2 Servei de Medicina de la Reproducció. Institut Universitari Dexeus. Barcelona.

INTRODUCCIÓN

Las peculiares características de la gametogénesis femenina permiten la caracterización indirecta del complemento cromosómico del ovocito a través del análisis del correspondiente 1er Corpúsculo Polar (1CP). Dicho análisis permite, si los resultados así lo indican, la utilización del ovocito analizado para fines reproductivos. Esta técnica puede aplicarse en la detección de aneuploidías.

Una de las causas de la disminución en la fecundidad al aumentar la edad materna es la presencia de aneuploidías en el embrión. Teniendo en cuenta que la mediana de edad de los pacientes que requieren técnicas de reproducción asistida es bastante elevada, la detección de ovocitos anómalos a través del análisis del 1CP podría ayudar a evitar la transferencia de embriones procedentes de ovocitos aneuploides pudiendo disminuir, así, la tasa de aborto y mejorar la implantación en este tipo de pacientes. Ambos efectos contribuirían a aumentar el índice de embarazos a término. El objetivo de nuestro estudio es detectar, mediante Diagnóstico Genético Pre-Implantacional analizando el 1CP, no sólo las aneuploidías autosómicas más comunes: 13, 16, 18, 21 y 22 (Munné y col. 2000) sino también las causadas por los cromosomas X, 1, 15 y 17 que, como sugirieron Bahçé y col. (1999), podrían también intervenir en las bajas tasas de éxito mencionadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Hasta este momento, se ha analizado el 1CP de 39 ovocitos (3 madurados in vivo, 29 madurados in vitro y 7 no fecundados) de mujeres de edades comprendidas entre los 18 y los 45 años. Después de su fijación (Durban y col. 1998) se han aplicado, mediante un protocolo adaptado a 1CP, dos rondas de hibridación in situ fluorescente (FISH) usando diferentes combinaciones de sondas centroméricas y locus específicas que permiten visualizar marcas correspondientes a cada cromátide. En la primera ronda, se han analizado los cromosomas 13, 16, 18, 21 y 22 con sondas marcadas, respectivamente, en SpectrumRed, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGreen y SpectrumGold (Vysis, NY, USA) y, en una segunda ronda, se ha utilizado una mezcla de sondas para los cromosomas X, 1, 15 y 17 marcadas, respectivamente, en SpectrumAqua, SpectrumOrange, SpectrumGreen y SpectrumOrange/SpectrumGreen.

RESULTADOS

Se diagnosticaron treinta y uno de treinta y nueve 1CP (79.5%). Catorce fueron euploides (45'2%) mientras que 17 resultaron aneuploides (54'8%). Los resultados se detallan en la siguiente tabla:

	Cr.13	Cr.16	Cr.18	Cr.21	Cr.22	Cr.1	Cr.15	Cr.17	Cr.X
Euploides	30	29	34	34	27	27	31	33	33
Hiperhapl. cr	2	1					1		
Hiperhapl. ctide	1	1			1				
Hipohapl. cr	2	5		2	1	3	1		1
Hipohapl. ctide				3	1	2		1	
No Diagnos.	4	3	2	2	8	9	6	5	5
Total Aneupl.	5	7	3	3	4	3	2	1	1

Abreviaciones: Hiperhapl.:Hiperhaploidía; Hipohapl.:Hipohaploidía; cr.:Cromosoma; ctide.:Cromátide.

La alteración cromosómica que se observó con más frecuencia fue la hipohaploidía para algún cromosoma (51'7%) mientras que el cromosoma más implicado en aneuploidías resultó ser el 16.

Conclusiones

La aplicación de dos rondas de FISH en extensiones de 1CP es una forma fiable de detectar ovocitos aneuploides para los 9 cromosomas analizados. Este protocolo aplicado en ciclos de FIV podría ser una manera de seleccionar sólo embriones procedentes de ovocitos euploides para transferir en pacientes de edad materna avanzada incrementando, así, las oportunidades de conseguir un embarazo.

Referencias: Bahçe y col.1999 J Assist Reprod Genet;16(4): 176-181. Durban y col. 1998 Hum Reprod 13(3):583-587. Munné y col. 2000 Prenat Diagn 20:582-586.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por Ministerio de Sanidad (FIS 98/0031-01); CIRIT (1997 SGR-00030). AP es becaria del programa de Formació de Personal Investigador de la Generalitat de Catalunya (FI/FIAP).

Diagnóstico genético preimplantacional de la enfermedad de huntington: puesta a punto de la técnica molecular

Romero C, Robledo M *, Fernández M, L. De la Fuente, L A, Fernández E

Fundación Jiménez Díaz, *Centro Nacional de Investigación Oncológica

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad genética que sigue un modelo de herencia Autosómica Dominante, con penetrancia completa y afecta a 1/10.000 nacidos vivos. El gen (IT15) responsable de la enfermedad se localiza en los brazos cortos del cromosoma 4, la mutación se produce por un incremento en el número de trinucleótidos CAG (glutamina) localizados en el extremo 5' del gen, en el primer exón. La EH es un síndrome neurodegenerativo de aparición tardía en el 80% de los casos que conduce a la incapacidad total del individuo 10 ó 15 años después de los primeros síntomas.

En la actualidad se puede realizar un diagnóstico Presintomático y Prenatal de la enfermedad. La posibilidad de realizar un Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) da la posibilidad a estas parejas a no tenerse que enfrentarse al aborto de un hijo que en el mejor de los casos llevará una vida completamente normal durante las tres primeras décadas de su vida.

OBJETIVOS

- 1) Puesta a punto del análisis genético molecular del gen responsable de la EH mediante la técnica de PCR.
- 2) Puesta a punto del análisis genético molecular del gen responsable de la EH en ADN extraído de blastómeros de embriones no aptos para la transferencia.
- 3) Análisis de la EH en parejas portadoras previo al DGP, con el fin de determinar su informatividad genética.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la puesta a punto de análisis molecular contamos con ADN extraído de sangre periférica de parejas portadoras del gen de la EH, así como embriones no aptos para la transferencia.

La metodología utilizada para la puesta a punto de la técnica de PCR es la siguiente: Una PCR semi-nested con una primera ronda de amplificación con los primers externos HD3/ HD2 y una segunda ronda de amplificación con los primers internos HD1/HD2:

- HD3 : ttt tac ctg cgg ccc aga
- HD2 : tcc tca gct tcc tca gcc gcc
- HD1 : atg gcg acc ctg gaa aag ctg atg aa

RESULTADOS

Presentamos los resultados obtenidos de la puesta punto de la PCR en 100 blastómeros biopsiados de embriones no aptos. Así mismo presentamos los resultados de la PCR en pacientes portadores de la EH y sus parejas pendientes de someterse a un DGP.

¿QUÉ APORTA EL DIAGNÓSTICO PREIMPLANTACIONAL EN PACIENTES CON ALTERACIONES MEIÓTICAS?

Arán B¹, Castelló C¹, Vidal F², Santaló J², F.García¹, Gimenez C², Boada M¹, Parriego M², Barri PN¹, Egozcue J², Veiga A1.

¹Servei Medicina de la Reproducció. Institut Universitari Dexeus.

²Unitat Biologia Cel.lular. Facultat de Ciències. UAB.

INTRODUCCIÓN

Los candidatos y las indicaciones para el diagnóstico genético preimplantacional (DGP) se han ampliado considerablemente a lo largo de los últimos años. Actualmente, su aplicación no solo evita la transmisión de anomalías genéticas a la descendencia si no también la posibilidad de ofrecer mejores perspectivas de éxito en algunos grupos de pacientes. Un grupo de pacientes en los que se plantea la utilidad del DGP es en los casos de factor masculino asociado a anomalías meióticas. El objetivo de nuestro trabajo ha sido valorar si el DGP está indicado en este tipo de pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha evaluado la incidencia de aneuploidías en los embriones obtenidos tras 16 ciclos de DGP realizados en 16 parejas que presentaban alteraciones en la meiosis masculina, comparándolos con los obtenidos en 40 ciclos de DGP en portadores de enfermedades ligadas a los cromosomas sexuales (grupo control A). En ambos grupos el diagnóstico genético se llevó a cabo mediante FISH utilizando sondas de DNA específicas.

Los resultados obtenidos en cuanto a tasa de implantación, embarazo y aborto en el grupo de pacientes con meiosis masculina alterada en los que se llevó a cabo DGP se han comparado con los obtenidos en 66 ciclos de FIV-ICSI realizados por 44 pacientes, también con alteraciones meióticas, pero en los que no se realizó DGP (grupo control B).

RESULTADOS

Se analizaron un total de 167 embriones del grupo de DGP, de los cuales un 47.3% eran normales para los cromosomas evaluados, el 27.5% presentaban anomalías y en el 25.1% no se obtuvo diagnóstico. En el grupo control A, se analizaron 286 embriones de los cuales 60.1% presentaban una dotación normal para los cromosomas estudiados, eran anormales el 16.8% y en el 15.7% no se obtuvo diagnóstico. Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de embriones anormales respecto a los diagnosticados entre ambos grupos ($p < 0.01$).

Al comparar los resultados de estos 16 ciclos de DGP con los obtenidos en 66 ciclos de FIV-ICSI realizados por el grupo control B, no se encuentran diferencias significativas ni en la tasa de embarazo (43.7% y 43.9% respectivamente), ni en la tasa de implantación (25% frente a 23.2%). En el grupo control B se produjeron 3 abortos (10.3%), mientras que no se produjo ninguno en el grupo de DGP, sin embargo las diferencias no son significativas.

CONCLUSIONES

Nuestros datos ponen de manifiesto que los embriones del grupo de pacientes candidatos a DGP por anomalías meióticas presentan un incremento en la tasa de aneuploidías respecto a nuestra serie control. Dado que las anomalías cromosómicas son un importante factor que condiciona las pérdidas embrionarias, nuestros resultados, aunque preliminares, sugieren que la selección de embriones realizada a través del DGP reduce la tasa de aborto en pacientes con meiosis masculina alterada.

Valor pronóstico del porcentaje de embriones con anomalías cromosómicas en el Diagnóstico Genético Preimplantacional por aborto de repetición

Santaló J, Vidal F, Giménez C, Parriego M, Egozcue J

Unitat de Biologia Cel.lular. Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona.
Bellaterra. Barcelona.

INTRODUCCIÓN

Recientemente el cribaje genético basado en el Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGPI) se ha venido utilizando, entre otras indicaciones, a fin de incrementar la tasa de embarazo en parejas con abortos de repetición.

MATERIAL Y MÉTODOS

En nuestro equipo hemos analizado 54 ciclos de DGPI en los que se realizó un cribaje genético para 7 cromosomas distintos (X,Y, 13, 16, 18, 21 y 22) considerados como los más directamente implicados en la inducción de abortos en las pérdidas gestacionales tempranas. De estos 54 ciclos, 30 corresponden a una indicación de aborto de repetición mientras que los otros 24 presentaban otras indicaciones para el DGPI y fueron utilizados como control. Dichos ciclos se llevaron a cabo en 7 centros de reproducción asistida distintos.

Se pretendía evaluar el porcentaje de embriones genéticamente anómalos detectados en cada ciclo y correlacionarlo con la tasa de implantación post transferencia. Para ello se determinó la media de los porcentajes de embriones cromosómicamente anómalos y se utilizó para establecer dos grupos de ciclos de DGPI: los que presentaban un porcentaje de embriones anómalos superior a la media y los que lo presentaban inferior. Se comparó también la media de edad de ambos grupos. La hipótesis de trabajo era establecer el porcentaje de embriones cromosómicamente anómalos en cada ciclo como un indicador de la probabilidad de éxito en estos casos, de forma que los ciclos con un mayor número de embriones anormales (lo cual indicaría un posible origen genético de los abortos) presentaran un mejor pronóstico de embarazo.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos, referidos al grupo de abortadoras de repetición, indican que las medias de edad son similares en ambos casos (35,36 años en el grupo de ciclos con un porcentaje de embriones anómalos superior a la media y 34,42 en el grupo con un porcentaje menor). Sin embargo la tasa de implantación era mayor (16,67%) en el grupo de abortadoras con un porcentaje de embriones anómalos superior a la media comparado con la del grupo con un porcentaje menor (6,45%). Por el contrario la situación se invertía en el grupo cuya indicación para el DGPI no eran los abortos de repetición previos: 0% de implantación en el grupo de no abortadoras con un porcentaje de embriones anómalos superior a la media comparado con la del grupo con un porcentaje menor (4,35%). En este caso las medias de edad de los dos grupos también eran diferentes: (36 años en el grupo de no abortadoras con un porcentaje de embriones anómalos superior a la media y 28,10 en el grupo con un porcentaje menor)

CONCLUSIÓN

Estos resultados preliminares parecen sugerir que, en los casos con una indicación de DGPI de abortos de repetición, el hecho de encontrar un número elevado de embriones cromosómicamente anómalos pudiera indicar un origen genético de los abortos previos y por tanto sugerir un buen pronóstico para el mismo. Esta información pudiera ser de utilidad en caso de plantearse la repetición de nuevos ciclos de DGPI en la misma pareja.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por la CICYT (SAF 98-0134) y por la Generalitat de Catalunya (CIRIT 2000 SGR-0067)

Influencia del diagnóstico genético preimplantacional (DGP) en la tasa de implantación de los blastocistos humanos

De los Santos M J, Mercader A, Albert C, Galán A, Zulategui J, Rodrigo L, Remohí J, Pellicer A, Simón C, Rubio C.

IVI-Valencia

INTRODUCCIÓN

Durante su desarrollo in vitro hasta blastocisto, los embriones humanos sufren un proceso de selección en base a su capacidad fenotípica así como a la carga cromosómica de la que son portadores. Por ello, muchos programas de reproducción asistida optan por la transferencia de blastocistos para incrementar la tasa de gestación e implantación. No obstante, un porcentaje importante de los embriones que alcanzan el estadio de blastocisto siguen llevando una carga cromosómica anormal lo cual puede influir en su potencial implantatorio.

El objetivo de este estudio es evaluar si la transferencia de blastocistos con un análisis cromosómico adicional mejora la tasa de implantación embrionaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo de 117 transferencias, 13 procedentes de DGP y 104 del programa de cocultivo realizadas en nuestro centro desde Julio de 1999 hasta Mayo de 2001. Todas las transferencias fueron realizadas exclusivamente con embriones en estadio de blastocisto. Los cromosomas estudiados mediante FISH fueron el 13, 16, 18, 21, 22, X, e Y (Vysis Inc., Downers Grove, IL). Los análisis estadísticos fueron realizados mediante los tests t-Student y Fisher. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

	Cocultivo (n=104)	PGD (n=13) células (n=95)	Cocultivo ≥3 embr. de 8 (n=10)	PGD ≥3 embr. de 8
Edad	33,4 ± 3,6	33,6 ± 3,3	33,5 ± 3,4	33,4 ± 3,3
Ovoc/paciente	23,6 ± 8,1	20,9 ± 8,1	20,5 ± 5,6	25,6 ± 7,26
% Blastocistos	34*	25*	37	40
Blast. Transf.	2,59 ± 1,0*	1,15 ± 1,2*	2,6 ± 0,8	2,38 ± 0,9
Tasa Gestación	46,2	46,2	44,2	60
Tasa Implant.	26,2*	44,0*	22,8*	50*
Tasa Aborto	14,6	16,6	15,58	16,6
* p<0.05				

CONCLUSIONES

La selección de blastocistos cromosómicamente normales mejora significativamente su capacidad de implantación y esta diferencia es más evidente en pacientes con buena calidad embrionaria. Aunque la tasa de gestación presenta a priori valores similares en los grupos analizados, ésta podría incrementarse en el subgrupo de pacientes de mejor pronóstico.

Correlación entre la morfología pronuclear y la presencia de anomalías cromosómicas embrionarias: estudio preliminar.

Gámiz P, Rubio C, Prados N, Romero JLL, Cobo A, Ruiz A, Simón C, Remohí J, Pellicer A, de los Santos MJ

Instituto Valenciano de Infertilidad (I.V.I.). Valencia.

INTRODUCCIÓN

La selección de los embriones a transferir es uno de los aspectos más importantes dentro de un programa de reproducción asistida y uno de los criterios utilizado para ello es la morfología de los pronúcleos. Se ha intentado correlacionar los distintos patrones de morfología pronuclear en los cigotos con su potencial desarrollo hasta blastocisto, así como su capacidad de implantación. En este sentido, el objetivo de nuestro trabajo fue valorar la posible correlación entre distintos patrones de morfología pronuclear y la presencia de anomalías cromosómicas embrionarias.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo en el que se incluyeron 43 pacientes de nuestro programa de diagnóstico genético preimplantacional (D.G.P.) en un periodo comprendido entre Noviembre de 2000 y Mayo de 2001. Las indicaciones en estas pacientes fueron: aborto de repetición, fallo de implantación y antecedentes de síndrome de Down. En todos los ciclos la inseminación ovocitaria se realizó mediante inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) y la morfología de los pronúcleos se valoró 17-20 horas tras la microinyección. Los cigotos fueron clasificados en base al tamaño de los pronúcleos (A= Tamaño similar, B= Distinto tamaño) y en tres categorías distintas en función del número de nucleolos, distribución y sincronía de los mismos. Grupo I: 3-4 nucleolos sincrónicos polarizados; Grupo II: 5-7 nucleolos sincrónicos comenzando a polarizar o 7-9 nucleolos sincrónicos dispersos; Grupo III: cualquier otra combinación no incluida en los grupos I y II. Los embriones desarrollados correctamente fueron biopsiados en el tercer día de desarrollo embrionario y analizados mediante hibridación in situ fluorescente (FISH) para los cromosomas 13, 16, 18, 21, 22, X e Y (Vysis Inc., Downers Grove, Il.).

RESULTADOS: Porcentaje de embriones normales para los cromosomas analizados (%).

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Totales
A	N = 27 8 (29.6)	N = 120 31 (25.8)	N = 96 17 (17.7)	N = 243 26 (23.1)
B	-	N = 8 3 (37.5)	N = 13 2 (15.4)	N = 21 5 (23.8)
Totales	N = 27 8 (29.6)	N = 128 34 (26.6)	N = 109 19 (17.4)	
Test exacto de Fisher no significativo.				

CONCLUSIONES

Debido al reducido número de embriones analizados no se observaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos estudiados. Sin embargo, existe una tendencia hacia un mayor porcentaje de embriones cromosómicamente normales en aquellos cigotos que presentan pronúcleos de tamaño similar (A) y nucleolos sincrónicos (Grupo I).

Estudio de microdeleciones del cromosoma Y en azoospermia secretora

Esbert M, Vendrell J.M, Carrera M, Barri PN, Veiga A.

Institut Universitari Dexeus.

Las microdeleciones del brazo largo del cromosoma Y han sido origen de estudio desde que fueron relacionadas con la esterilidad de origen masculino. El Yq 11 (brazo largo del cromosoma Y) se subdividió, en principio, en tres partes: AZFa, AZFb y AZFc (que contiene el gen DAZ, de deleted in azoospermia). La ausencia de cada una de ellas se corresponde con unas características fenotípicas testiculares determinadas. La deleción de AZFa no es muy frecuente y se relaciona con el síndrome de sólo células de Sertoli, la de AZFb con bloqueo meiótico (ausencia de espermatozoides maduros a nivel testicular) y la de AZFc, que es la más frecuente, con oligozoospermia severa (< 10 Millones espermatozoides / ml de eyaculado) y azoospermia. Estudios recientes han descrito una cuarta zona, AZFd, que se corresponde fenotípicamente con una oligozoospermia moderada (<20 Millones / ml eyaculado) así como con una teratozoospermia.

En nuestro estudio se han incluido 24 pacientes con azoospermia secretora, que acudían a nuestro centro para tratamiento de esterilidad. Se ha comparado la frecuencia encontrada de microdeleciones del cromosoma Y en nuestros pacientes, con la frecuencia descrita en la bibliografía. También era relacionada la presencia de una determinada microdeleción con el resultado de la biopsia testicular, sobretudo en cuanto a la existencia o no de espermatozoides testiculares.

La frecuencia con la que se encuentran estas microdeleciones varía mucho según los pacientes en que se realiza el estudio. En general se considera que entre un 12-15 % de los pacientes azoospermicos tienen microdeleciones en el brazo largo del cromosoma Y. En nuestro caso hemos realizado una PCR (polymerase chain reaction) para estudiar la presencia de microdeleciones en linfocitos de sangre periférica, utilizando 4 STS (sequence-tagged sites). Detectamos 3 casos de microdeleciones, lo que representa una frecuencia del 12,5 %. Se encontró una microdeleción de cada región estudiada, y el diagnóstico de las biopsias testiculares realizadas concordaron con lo que era esperado.

El hecho de que estas microdeleciones puedan ser heredadas por los hijos varones, y el valor pronóstico que podría ofrecernos en cuanto a la presencia de espermatozoides a nivel testicular, hace que esta prueba sea recomendada a los pacientes estériles que se quieran someter a un tratamiento de reproducción asistida en nuestro centro.

Caracterización de las poblaciones celulares del eyaculado y biopsia de testículo mediante el análisis del DNA por citometría de flujo.

Garrido N^{1,2}, Meseguer M^{1,2}, Gil-Salom M^{1,2}, Simón C^{1,2}, Pellicer A^{1,2}, Remohí J^{1,2}

I Departamento P.O.G, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia; Laboratorio de 2 Andrología y Banco de Semen, Instituto Valenciano de Infertilidad;

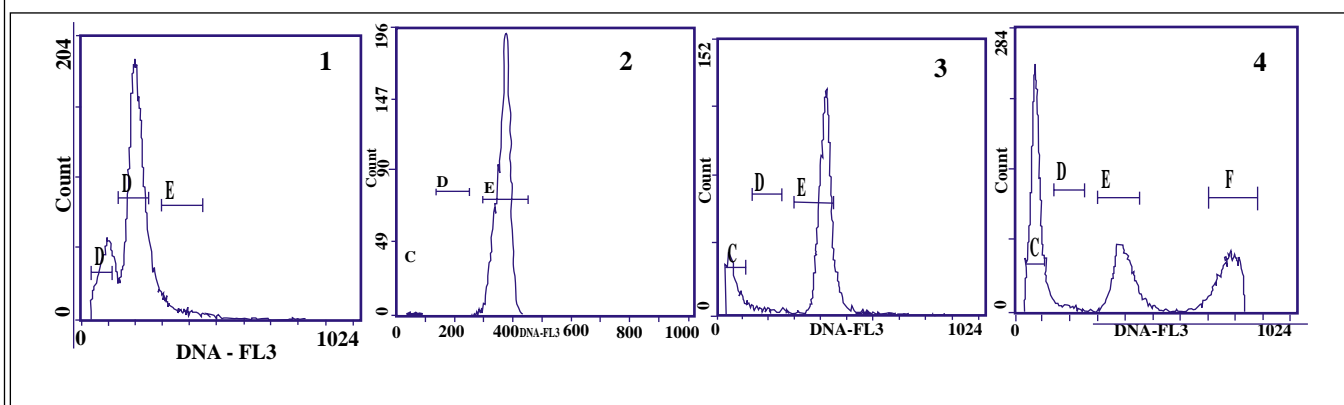
INTRODUCCIÓN

Un sistema válido y reproducible, basado en una diferencia constante que presentan las células de la espermatogénesis respecto a otros tipos celulares en el tejido testicular y semen, es el estudio del contenido en material genético. Por definición, las células precursoras de los gametos a partir de las espermátides contienen un juego completo de cromosomas (haploides) al igual que los espermatozoides, mientras que todos los tipos celulares somáticos contienen dos (diploides). Esta diferencia puede ser utilizada para analizar, en las muestras de los pacientes seleccionados, la presencia del tipo celular de interés con una tinción de DNA y técnicas de citometría de flujo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron muestras de eyaculado completo con espermatozoides, sin espermatozoides y con células redondas, biopsia de testículo, semen capacitado y células linfocitarias procedentes de sangre como control diploide (n=10). La biopsia fue disgregada mecánicamente primero, y enzimáticamente luego, utilizando para ello colagenasa y DNAsa, y, tras filtrar los tamaños mayores, procedimos de la misma forma que con los eyaculados. Las muestras fueron separadas del plasma y/o medio de cultivo, fijadas y permeabilizadas con etanol 70% y su concentración normalizada a 100.000 cel/ml. Posteriormente fueron teñidas con Yoduro de Propidio (fluorocromo de unión al DNA). A continuación, las células en suspensión fueron analizadas en el citómetro de flujo (Epics Elite, Coulter). Al menos se analizaron 10.000 células por muestra.

RESULTADOS



Tras la caracterización de la cantidad de DNA de los espermatozoides capacitados (grupo control haploide n) (1) y de las células linfocitarias (grupo control diploide 2n)(2), definimos las siguientes ventanas de señal fluorescente; C: debris celular, D: células haploides, E: células diploides, F; células tetraploides. Pudimos clasificar y cuantificar la presencia de leucocitos en un eyaculado con ausencia de espermatozoides (3) y la ausencia de espermatozoides y presencia de células de la línea germinal diploides y tetraploides en una biopsia de testículo de pacientes azoospermicos (4). Los resultados fueron confirmados mediante el estudio anatómo-patológico de extensiones de las mismas muestras teñidas mediante hematoxilina-eosina. Se valoraron 200 células por muestra.

CONCLUSIONES

El análisis de DNA mediante citometría de flujo es una técnica válida, reproducible y rápida para caracterizar las poblaciones celulares del eyaculado o de la biopsia de testículo que puede sustituir de manera eficiente a métodos diagnósticos tradicionales como la tinción histológica, o inmunohistoquímica del tejido o suspensión celular.

Fragmentación de DNA en subpoblaciones de espermatozoides en diferentes fases de maduración

Alvarez J G^{1,2}, Ollero M¹, Evenson D P³, Ashok Agarwa^{1,4}, Vazquez R², JFernández J L², VGoyanes V²

¹Harvard Medical School, Boston; ²Unidad de la Mujer, Hospital Santa Teresa-USP, La Coruña; ³South Dakota State University, Brookings, South Dakota; ⁴The Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, Ohio.

INTRODUCCIÓN

El grado de fragmentación de DNA en esperma humano ha sido recientemente identificado como un indicador de fallo de embarazo tras la fecundación in vivo e in vitro. Sin embargo, el mecanismo responsable de esta fragmentación todavía no se conoce. Se ha demostrado que los radicales libres del oxígeno (ROS) inducen fragmentación de DNA in vitro y que la fragmentación de DNA puede producirse después de la espermiación durante la migración de los espermatozoides a lo largo de los túbulos seminíferos y el epidídimo. En este estudio se determinó la producción de ROS y la fragmentación de DNA en espermatozoides humanos en diferentes fases de maduración.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de semen obtenidas de donantes (n=16) y pacientes de infertilidad (n=32) se clasificaron como muestras con parámetros de semen normales (PSN) o anormales (PSA), de acuerdo con los criterios de la OMS. Cuatro fracciones de células espermáticas fueron aisladas utilizando un gradiente de densidad de ISolate (47/70/90%). La producción de ROS se determinó utilizando el método estándar de quimioluminiscencia con luminol. El logaritmo de los niveles de ROS producidos por espermatozoides de una fracción multiplicado por la concentración espermática relativa en esa fracción fue designado como nivel relativo de ROS (Rel-ROS). La fragmen-

Grupo	Fracción 1	Fracción 2	Fracción 3	Fracción 4	Rel-ROS-2
Donantes	50,5±16,21	29,4±15,85	16,08±11,21	8,11±6,82	0,71±0,24
Pt PSN	55,2±18,05	27,1±16,97	21,56±10,39	14,45±7,31	0,95±0,25
Pt PSA	52,6±15,74	32,5±14,57	29,76±11,05	29,23±7,63	2,30±0,41

tación de DNA se determinó utilizando el Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) y se expresó como %COMP_{at}. Los resultados se muestran en la siguiente tabla (media±SD):

RESULTADOS

Los niveles más altos de ROS se encontraron en la fracción 2 (espermatozoides inmaduros con retención proximal de citoplasma) y los más bajos en la fracción 4 (espermatozoides maduros) (P<0.001). Los valores de

%COMP_{ot} más altos se obtuvieron en la fracción 1 (células germinales inmaduras) y los más bajos en la fracción 4 (P<0.0001). Los valores de %COMP_{ot} en espermatozoides de la fracción 4 fueron significativamente más altos en muestras de semen obtenidas de pacientes con PSA en comparación con muestras de pacientes con PSN o donantes (p<0.001). No se encontraron diferencias significativas en los valores de %COMP_{ot} en espermatozoides de la fracción 4 entre muestras obtenidas de donantes y de pacientes con PSN (p<0.0001). Los valores relativos de ROS en la fracción 2 (Rel-ROS-2) se correlacionaron significativamente con los valores de %COMP_t en espermatozoides de la fracción 4 (r=0.86) (P<0.002). El ROC análisis indicó que un Rel-ROS-2 de 1.2 resultaría en un valor predictivo óptimo de fragmentación de DNA en espermatozoides de la fracción 4. Cuando se aplicó este valor, la sensibilidad fue del 84%, la especificidad un 92%, el valor predictivo negativo un 94% y el valor predictivo positivo un 78%.

CONCLUSIONES

Dado que las células inmaduras y los espermatozoides maduros coexisten en estrecho contacto durante su migración a lo largo de los túbulos seminíferos y el epidídimo, es posible que esto resulte en una inducción de la fragmentación de DNA en espermatozoides maduros como consecuencia de la producción de ROS por espermatozoides inmaduros.

Este trabajo de investigación ha sido financiado en parte por el Ministerio de Educación.

Ultraestructura de espermatozoides enteros en medio hipoosmótico (HOST)

Goyanes V, Delgado A, Fernández J L, Gutierrez M, Campos A, Alvarez J, Segrelles E

Hospital Juan Canalejo, Genética-Unidad de la Mujer - Hosp. Sta. Teresa USP - La Coruña

INTRODUCCIÓN

El test hipoosmótico (HOST) (Drevius y Eriksson, 1966) se viene utilizando como un indicador de capacidad fertilizante (Vam der Ven et al, 1986) en el varón. Incluso algunos autores como Chuan et al 1985 lo proponen como la alternativa más económica y rápida al test de penetración en ovocitos de hamster. La alteración estructural que define un espermatozoide HOST positivo, ha sido descrita por diversos autores, como un edema intracitoplasmático y de membranas, repercutiendo en todo el espermatozoide, pero preferentemente en la cola, produciendo un enrollamiento característico de la misma.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tras swim-up, los espermatozoides fueron tratados durante 30 min a 37°C con el test HOST (citrato sódico y glucosa). Seguidamente se fijaron centrifugándolos en rejillas de M.E. cubiertas de Formvar (Goyanes, 1985). Tras deshidrataciones progresivas, espermatozoides no tratados y tratados con la solución HOST, fueron examinados al M.E. de transmisión sin tinción previa.

RESULTADOS

No se observó ninguna alteración significativa de la densidad electrónica de la cabeza, que se mostró notablemente electrondensa y sin objetivarse edemas ni separación de membranas. Tampoco se apreciaron cambios en la compactación de la cromatina nuclear. Destacó en la cola, la presencia de estructuras en posición periférica, de tamaño 10 veces inferior al diámetro de la cola, formando anillos o espirales, rodeando un eje central electrondenso correspondiente al sistema microtubular. A este nivel el cambio fundamental es un enrollamiento en dirección proximal, de intensidad muy variable, así como angulaciones abruptas sin enrollamientos. En ningún caso se observaron edemas, hinchazón o separación de membranas.

Las medidas correspondientes a los tamaños de todas las estructuras del espermatozoide no mostraron cambios con respecto a los controles.

DISCUSIÓN

La elevada densidad electrónica que presentan estas muestras no teñidas, indica el buen nivel de preservación de estas estructuras. También se evidenció, una clara nitidez de sus bordes. De haberse producido extracción o desplazamiento de material membranoso o intercelular, edemas, hinchamiento, etc, se observaría una disminución de la densidad electrónica de la estructura correspondiente, con respecto a los controles. Estos resultados contradicen la opinión de que el choque hipoosmótico produce un incremento del volumen celular debido a almacenamiento intra-

celular de líquidos, y fenómenos de hinchazón y doblamiento de la cola (Drevius y Eriksson 1966). Tampoco coinciden con Mahiques et al. (1987), en su propuesta de que la membrana de la cola sería más susceptible a los cambios iónicos que la del resto de la célula. Sugirieron que dicha membrana es la única que sufre un incremento de volumen debido a un edema de la misma, dando como resultado los enrollamientos y demás cambios característicos. Sus observaciones pueden ser artefactos de fijación y procesado.

Nuestra conclusión es que la respuesta del espermatozoide a las soluciones hipoosmóticas (HOST) es un proceso físico-químico y cinético de la estructura macromolecular de la cola, que no se debe a edema de membranas.

Fecundación interespecífica de ovocitos porcinos con espermatozoides bovinos como método de evaluación espermática

Gardón J C*, Matás C**, Coy P**, Gadea J**

* Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Lomas de Zamora. Argentina

** Dep. Biología Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. España

INTRODUCCIÓN

El test de penetración in vitro de ovocitos de hamster libres de zona pelúcida ha sido utilizado para evaluar la capacidad de penetración de los espermatozoides de diversas especies (Yanagimachi. Gamete Res 10, 187-232, 1984). Para los espermatozoides de las especies de interés zootécnico, como la bovina, la utilización de ovocitos de la especie porcina podría ser más adecuado, por la facilidad de obtención de los mismos, los buenos resultados que se obtienen en los procesos de maduración in vitro y por estar más próximo filogenéticamente. El objetivo de este trabajo fue la evaluación y puesta a punto de la técnica de penetración de ovocitos porcinos madurados in vitro y libres de zona pelúcida, utilizando espermatozoides de la especie bovina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ovocitos porcinos recolectados de ovarios provenientes de matadero fueron puestos a madurar in vitro durante 44 horas en medio NCSU-37. Finalizado el periodo de maduración, los ovocitos fueron sometidos a tratamiento con pronasa al 0,1% durante 2,5 min a temperatura ambiente a efectos de eliminar la zona pelúcida. El semen bovino congelado en condiciones comerciales se descongeló mediante inmersión a 37°C durante 30 seg. y fue diluido en medio TCM-199 suplementado con BSA, cafeína - benzoato de sodio y heparina. Las muestras de semen fueron centrifugadas a 500g durante 10 min y los pellets resuspendidos en el mismo medio sin cafeína ni heparina. La concentración final de espermatozoides fue ajustada a $1,5 \times 10^6$ células/ml. Seguidamente se procedió a preparar las gotas de inseminación de 100 μ l. Los ovocitos madurados fueron lavados tres veces en medio de fecundación y colocados en grupos de 20 por microgota de semen y cultivados durante 18 horas a 38,5 °C y 5% de CO₂ en aire. Posteriormente, los ovocitos fueron fijados y teñidos para su evaluación.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

El semen utilizado presentaba unos valores medios de 71% de vitalidad y 58% de acrosomas intactos. Del total de ovocitos utilizados, el 34,52% (29/84) fueron penetrados, de los cuales 79,31% (23/29) fueron monospermicos y 93,10% (27/29) formaron pronúcleo masculino. Se verifica la penetración interespecífica cuando se utilizan ovocitos porcinos libres de zona pelúcida. Esta técnica podría ser utilizada para evaluar la calidad de los espermatozoides bovinos cuando no se dispone de ovocitos homospecíficos, del mismo modo que se ha utilizado extensamente el test de ovocito de hamster libre de zona (Brackett y cols., Gamete Res 5, 217- 227. 1982). Esta técnica podría aplicarse a otras especies, incluida la humana, de modo que los ovocitos porcinos madurados in vitro fueran utilizados como un bio-reactivo más. Dentro del orden de los artiodáctilos, se ha demostrado previamente la capacidad de penetración in vitro de ovocitos bovinos con espermatozoides ovinos (Slavik et al., Mol Reprod Dev 25:345-347,

1990), penetracion in vitro de ovocitos bovinos y ovinos con espermatozoides caprinos (Slavik y Fulka, Theriogenology 38, 721-726,1992) y fecundación entre gametos ovinos y caprinos (Eppelston y Moore, Theriogenology 8, 165, 1977).

Hasta el momento, los espermatozoides bovinos han sido inyectados (ICSI) en ovocitos porcinos madurados in vitro con una exitosa activación (89,42%) y formación del pronúcleo masculino (51,92%) (Kim et al., Mol Reprod Dev 53, 84-91,1999). Por otra parte, Sartini y Berger (Mol. Reprod. Dev. 55, 446-451, 2000) han demostrado la unión de espermatozoides bovinos a la membrana plasmática de ovocitos porcinos libres de zona. Sin embargo, hasta el momento no se ha encontrado ninguna referencia de penetración y formación de pronúcleos cuando se utilizan un sistema FIV con ovocitos de cerdo libres de zona.

Modificación de las técnicas de inseminación en el momento del FIV ó del ICSI. ¿Es posible mejorar la calidad embrionaria?

Ruiz Jorro M, Vila Marqués M, Dolz Arroyo M, Calatayud Lliso C.

CREA (Centro Médico de Reproducción Asistida). Valencia

INTRODUCCIÓN

Continuamente se trata de mejorar la calidad embrionaria modificando las condiciones ambientales o de cultivo en los laboratorios de embriología, con el fin de conseguir mejores resultados en los tratamientos de FIV e ICSI. En este estudio prospectivo, nos planteamos unas sencillas modificaciones en la inseminación (en los casos de FIV) o microinyección (en los casos de ICSI) de los ovocitos, para valorar si estos cambios nos permitían seleccionar embriones de mejor calidad en el momento de su transferencia.

MATERIAL Y METODOS

De forma prospectiva y aleatoria, la mitad de los ovocitos, en los casos de FIV , fueron retirados de la gota con espermatozoides y colocados en una gota limpia de medio de cultivo, 90 minutos después de su inseminación, basándonos en estudios (1) que indican que los espermatozoides liberan sustancias que pueden afectar a la calidad del futuro embrión y que el hecho de estar 15 horas menos en contacto con ellos puede disminuir este efecto deletéreo. En los casos de ICSI , también de forma prospectiva y aleatoria, se situó el corpúsculo polar a las 11 horas ó a las 7 horas, en el momento de microinyectar los ovocitos. Hay estudios (2) que indican que es posible obtener embriones con mejor potencial de implantación situando el corpúsculo polar a las 7 ó a las 11 horas (en lugar de hacerlo a las 6 ó a las 12) en el momento de la microinyección y otros trabajos (3) afirman que al microinyectar el espermatozoide con el corpúsculo polar situado abajo, el ovocito fecundado podría empezar a dividirse antes, por lo que posiblemente podríamos elegir mejor los embriones en el momento de transferirlos, tres o cinco días después de la aspiración folicular. En cada caso se comparó la tasa de fecundación, los patrones de distribución de los nucleolos (4), la tasa de embriones con células multinucleadas el primer día de división, de embriones de buena calidad en cada día de división y la media de células por embrión en cada día de división, así como otros parámetros, todo ello para saber, fundamentalmente, si alguna de estas modificaciones hacía que los embriones se dividieran mejor o más rápidamente.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a tasa de fecundación, número de células o calidad embrionaria en los casos de ICSI, cuando los ovocitos fueron microinyectados con el corpúsculo polar a las 11 ó las 7 horas. En los casos de FIV convencional, tampoco se encontraron diferencias en cuanto a la tasa de fecundación, ni en el porcentaje de embriones de buena calidad cuando los ovocitos fueron retirados de los espermatozoides 90 minutos después de haber sido inseminados. Sí se aprecia sin embargo una tendencia (no estadística) en este último caso, a conseguir embriones de mejor calidad, que podría llegar a ser significativa al aumentar el número de casos analizados, que en este estudio ha sido de 32 ciclos de FIV y 36 de ICSI, siendo la tasa de embarazo por transferencia del 40´6% y del 44´4% , respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Dirnfeld M, Bider D, Koifman M, Calderon I, Abramovici H.:** Hum. Reprod, 1999, 14 (2562-2564)
2. **Blake M, Garrisi J, Tomkin G, Cohen J :** Fertil.Steril, 2.000, 73 (31-37).
3. **Van der Westerlaken L.A.J, Helmerhorst F.M et all.:** Hum. Reprod, 1999, 14 (2565-69)
4. **Tesarik J, Junka A.M, Hazout A.:** Hum. Reprod, 2.000, 15 (1396-99)

Calidad ovocitaria y apoptosis en células de la granulosa

Castilla JA, Clavero A, Suárez I, Núñez AI, Luceño F, Esparza C, Poyatos A, Mendoza N, Martínez L

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

INTRODUCCIÓN

La apoptosis de las células de la granulosa (CG) constituye un marcador de calidad folicular. Nosotros hemos estudiado la posible relación entre este parámetro y la madurez y fecundabilidad de los ovocitos mediante microinseminación espermática en mujeres sometidas a desarrollo folicular múltiple.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamos CG de 64 líquidos foliculares claros en pacientes de nuestro programa de ICSI por factor masculino. Tras la obtención del líquido folicular sin signos macroscópicos de contaminación sanguínea, procedíamos al aislamiento y separación del ovocito, el cual se clasificaba en metafase I o metafase II, y en fecundado o no fecundado según criterios morfológicos. El aislamiento de las CG se realiza mediante la separación de las CG de la contaminación con hematíes y leucocitos polimorfonucleares mediante centrifugación en gradientes de Ficoll-Hypaque. Tras lavado de las células realizamos la tinción de las mismas con anexina V marcada con fluoresceína, la cual mide apoptosis, y se evalúa posteriormente mediante citometría de flujo.

RESULTADOS

No hemos encontrado relación entre el grado de apoptosis en CG y la madurez del ovocito ($3.8 \pm 0.5\%$ en CG de folículos con ovocitos en metafase I vs $3.2 \pm 0.3\%$ en folículos con ovocitos en metafase II). Del mismo modo tampoco obtuvimos relación alguna entre la apoptosis presente en las CG procedentes de folículos cuyos ovocitos fecundaron o no ($3.1 \pm 0.3\%$ vs $3.5 \pm 0.5\%$ respectivamente).

CONCLUSIONES

Estos resultados indican que la apoptosis de las CG no influye en la calidad del ovocito recuperado en mujeres sanas que se encuentran en tratamiento de estimulación de la ovulación. Dado que la apoptosis se ha observado fundamentalmente en los folículos atrésicos, mientras que el folículo dominante tiene unas tasas de apoptosis reducidas, es razonable que en los folículos estimulados con FSH, la cual es un factor de supervivencia muy importante para las CG, existan escasas células en apoptosis, por lo que no se encuentra relación con la expresión de moléculas en su superficie, ni con la calidad folicular. Sin embargo, en otros momentos del desarrollo folicular, como en la atresia o en la formación del cuerpo lúteo, pueden existir implicaciones importantes de la apoptosis en las CG sobre la fisiología folicular.

Estudio citoquímico ultraestructural de la zona pelúcida de ovocitos humanos

Gómez-Torres MJ^{**}, Avilés M^{*}, Fernández-Colom PJ^{***}, Jiménez-Movilla M^{*}, Girela JL^{**},
Castells MT^{*}, De Juan J^{**}, Romeu A^{***} y Ballesta J^{*}

^{*}Departamento de Biología Celular, Universidad de Murcia, Murcia, ^{**}Departamento de Biotecnología, Universidad de Alicante, Alicante y ^{***}Unidad de Reproducción Humana, Hospital Universitario La Fe, Valencia.

INTRODUCCIÓN

La zona pelúcida (ZP) es una cubierta extracelular que envuelve al ovocito ovárico, ovulado y a los embriones en estadios tempranos. Esta matriz está principalmente constituida por tres glicoproteínas altamente glicosiladas y está involucrada en el reconocimiento espermático, unión espermática, reacción acrosómica y protección del embrión (1,2). Se ha demostrado en varias especies incluido en el hombre que los carbohidratos juegan un papel importante durante la unión primaria entre el espermatozoide y el ovocito (1, 3, 4). En este trabajo, hemos estudiado la composición de carbohidratos presentes en la ZP y gránulos corticales de ovocitos humanos usando técnicas citoquímicas de lectinas e inmunocitoquímica a nivel ultraestructural.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ovocitos humanos en metafase II fueron obtenidos de pacientes incluidas en el Programa de Fecundación In Vitro del Hospital Universitario "La Fe" de Valencia, a las que se les estimuló la ovulación mediante FSH hasta el día de la administración de la gonadotropina coriónica humana (hCG) que fue administrada cuando, al menos, tres folículos alcanzaron un diámetro mayor de 16 mm. Entre 34-36 horas después de la administración de la hCG los ovocitos fueron obtenidos mediante punción-aspiración folicular por vía vaginal guiada por ultrasonidos y fijados por inmersión en glutaraldehído al 2%. Los ovocitos fueron incluidos en Lowicryl K4M. Las secciones ultrafinas fueron incubadas con diferentes lectinas conjugadas con digoxigenina (AAA, DSA, GNA, LTA, MAA, SNA, WGA). También se utilizaron varios anticuerpos monoclonales frente a los antígenos lewis y sialil-lewis.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

La ZP fue intensamente marcada con las lectinas WGA, DSA, MAA y AAA. Un alto marcaje se observó en la ZP con los anticuerpos anti-sialil-lewis a anti-sialil-lewis x. Sin embargo, con el resto de lectinas y anticuerpos no detectamos ningún marcaje. Los resultados obtenidos con las lectinas sugieren la presencia de los siguientes residuos glucídicos terminales: GlcNAc (WGA), Gal(1, 4GlcNAc (DSA), Neu5Ac(2,3 (MAA) y Fuc (AAA). Los estudios inmunocitoquímicos demostraron la presencia de los antígenos sialil-lewis a y x. La mayoría de los residuos glucídicos detectados son distribuidos homogéneamente en la ZP, sin embargo algunos están restringidos principalmente a la región más externa de la ZP. Los gránulos corticales fueron reactivos a las lectinas AAA, WGA, MAA y DSA y a los anticuerpos anti-sialil-Lewis x.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Wassarman et al.:** 2001. Nature Cell Biology 3: E59-E64.
2. **Yanagimachi.:** In "Physiology of Reproduction".1994, Eds. Knobil.
3. **Miranda PV et al.:** Molecular Human Reproduction, 1997, 3:399-404.
4. **Oehninger S.:** Cells Tissues Organs, 2001, 168: 58-64.

Este estudio fue subvencionado por la Fundación Salud 2000, PM99-0137 and BFI2000-156.

Caracterización de los carbohidratos de la zona pelúcida de ovocitos de oveja

Avilés M, Martínez-Alonso E, Lorenzo P L, Abascal I, ; Sánchez de Lollano J, Illera M J, Ballesta J

Departamento de Biología Celular, Universidad de Murcia

INTRODUCCIÓN

Durante la fertilización, ocurre un reconocimiento específico entre dos células especializadas, el espermatozoide y el ovocito. Se ha sugerido que diferentes moléculas presentes en la membrana plasmática del espermatozoide reconocen residuos glucídicos contenidos en las glicoproteínas de la envoltura extracelular que rodea al ovocito, llamada zona pelúcida (ZP) (1,2). Esta envoltura está altamente glicosilada (1-4). Tras la fertilización, tienen lugar cambios biológicos en la ZP debido a la liberación del contenido de los gránulos corticales lo que previene la poliespermia. En este estudio, hemos investigado la composición de carbohidratos de la ZP y gránulos corticales de ovocitos ováricos de oveja, utilizando citoquímica de lectinas-oro e inmunocitoquímica-oro a nivel ultraestructural.

MATERIALES Y MÉTODOS

Oocitos de oveja obtenidos de folículos antrales se fijaron por inmersión en glutaraldehído al 2% en tampón cacodilato (pH 7.4) durante 2 h a 4°C; los oocitos se lavaron abundantemente en tampón cacodilato 0.1 M y seguidamente fueron deshidratados en concentraciones crecientes de metanol para ser, posteriormente embebidos en Lowicryl K4M de acuerdo con el procedimiento rutinario. Secciones ultrafinas fueron incubadas con distintas lectinas conjugadas con digoxigenina (AAA, DBA, DSA, MAA, MPA, WGA) y con un anticuerpo policlonal contra alfa-galactosa humana. Partículas de oro coloidal se utilizaron para la visualización del marcaje en el microscopio electrónico de transmisión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la ZP observamos un intenso marcaje usando las lectinas AAA, DSA, MAA, MPA y WGA. El marcaje se detectó en todo el espesor de la ZP. Con WGA, DSA y MAA encontramos una distribución homogénea, mientras que con AAA y MPA se detectó una mayor reactividad en la región externa de la ZP. No se halló marcaje con DBA. Estos resultados sugieren que las glicoproteínas de la ZP contienen Fuc (AAA), Gal(1,4GlcNAc (DSA), Neu α (2,3 (MAA), GalNAc (MPA) y GlcNAc (WGA). También, se pone de manifiesto, la presencia de residuos terminales alfa-Gal mediante la utilización de un anticuerpo policlonal humano, siendo el marcaje mayor en la región externa de la ZP. La existencia de estos mismos residuos glucídicos se han observado en los gránulos corticales, los cuales fueron reactivos a las lectinas WGA, AAA, DSA, MAA y MPA, y al anticuerpo contra alfa-Gal humana.

BIBLIOGRAFIA

1. **Yanagimachi.**: In Knobil E, Neill JD, editors. "Physiology of Reproduction". New York: Raven Press, 1994, Vol I: 189-317.
2. **Wassarman et al.**: Nature Cell Biology, 2001, 3: E59-E64.
3. **Avilés et al.**: Biology of Reproduction, 1997, 57:1155-1163.
4. **Avilés et al.**: Molecular Reproduction Development, 2000, 57:296-308.

Este estudio ha sido financiado por el proyecto (PM99-0137 y BFI2000) del MCyT. I. Abascal disfruta de una beca de CajaMurcia (Murcia, España).

Transferir 2 ó 3 embriones: ¿podemos disminuir la tasa de gestaciones múltiples?

Andrés L, Cuadros Fernández J, Martínez M, Peramo B, Hernández E R, Ricciarelli E

Clínica Madrid FIV Madrid y CSIC

INTRODUCCIÓN

Según los datos del registro de la SEF (1998), un 74% de las transferencias se realizan con 3-4 embriones. Esto genera un 35% de gestaciones múltiples de las cuales el 7% son triples. En base a los graves efectos secundarios materno-fetales de las gestaciones múltiples, son cada vez más los grupos que abogan por limitar a 2 el número de embriones a transferir. El objetivo del presente trabajo es analizar los resultados de la transferencia de 2 vs 3 embriones que han sido seleccionados según las variables utilizadas habitualmente y, además, por la ausencia de blastómeros multinucleadas (MNBs).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron 136 ciclos con transferencia de embriones sin tener en cuenta la presencia de MNBs, de las que 53 fueron de 2 embriones y 83 de 3. También se estudiaron 92 ciclos con transferencia de embriones seleccionados por la ausencia de MNBs, de las cuales 32 fueron de 2 embriones y 60 de 3.

RESULTADOS

La tasa de embarazo global en pacientes a las que se transfirieron 3 embriones sin tener en cuenta las MNBs fue del 40%, con un 20% de embarazos gemelares y un 1% de triples; mientras que en los que se transfirieron 3 embriones sin MNBs se obtuvo un 61% de embarazos, un 32% de gemelares y un 8% de triples. Estos porcentajes de embarazos múltiples aumentaron aún más en ciclos de donación de oocitos, donde se obtuvo un 11% de embarazos triples. Por el contrario, en los 32 ciclos en los que se transfirieron 2 embriones sin MNBs, se consiguió una tasa de embarazo del 38%, con un 25 % de embarazos gemelares, similar a la obtenida cuando se transfirieron 3 embriones sin seleccionar (40%).

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los graves riesgos materno-fetales derivados de las gestaciones múltiples, y con el fin de evitar los embarazos triples, creemos que con una selección embrionaria adecuada es necesario limitar a 2 el número de embriones a transferir, a pesar de que eso conlleve una disminución en la tasa de gestación con respecto a la transferencia de 3 embriones.

Relación entre los embarazos múltiples, la calidad embrionaria y la edad de las pacientes

Herrer R¹, Aragonés M¹, Scheffer R¹, Cabañes I¹, Isaza V¹, Mínguez Y¹, Simón C¹

¹IVI-Madrid

OBJETIVO

Estudiar la relación entre los embarazos múltiples, la calidad de los embriones transferidos y la edad de las pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo de 233 ciclos de pacientes de FIV e ICSI en los que se transfirieron 3 embriones en día 2, distribuidos en tres grupos: grupo A (pacientes (33 años), grupo B (34 a 36 años) y grupo C ((37 años). Las tasas de gestación, implantación y múltiples se resumen en TABLA 1.

Tabla 1

	Grupo A (≤33 años)	Grupo B (34 a 36 años)	Grupo C (≥37 años)
Número de ciclos	115	74	44
Tasa gestación (%)	65% (75/115) ^a	45% (34/74) ^{a,b}	43% (18/44) ^{a,b}
Tasa implantación (%)	36% (125/345) ^c	23% (50/222) ^{c,d}	19% (25/132) ^d
Tasa múltiples (%)	53% (40/75) ^e	41% (14/34) ^e	39% (7/18) ^e

a.p<0.05; b.NS; c. p<0.05; d.NS; e.NS chi square

Evaluamos ahora la calidad de los embriones transferidos dentro de cada grupo en función del nº de embriones de buena calidad: Embriones G1: 4 células, grado 1 de fragmentación, grado 1 de simetría. Embriones G2: 4, 5 ó 6 células, grado de fragmentación y simetría 1 ó 2. Tabla 2.

Hicimos lo mismo uniendo los dos grupos de embriones (Tabla 3).

RESULTADOS

Tabla 2

	Grupo A			Grupo B			Grupo C		
	T. gest %	T. impl %	T.mult %	T. gest %	T. impl %	T.mult %	T. gest %	T. impl %	T.mult %
0 G1	65(35/54)	36 ^a	51(18/35)	49(19/39)	24 ^a	42(8/19)	32 (9/28)	16 ^{a,d}	33(3/9)
1 G1	61(17/28)	21 ^c	59(10/17)	50(8/16)	25	37(3/8)	37 (3/8)	12 ^e	33(1/3)
2 G1	60(12/20)	37	67(8/12)	53(6/13)	13	33(2/6)	100(4/4)	50 ^e	50(2/4)
3 G1	84(11/13)	46 ^{b,c}	36(4/11)	17(1/6)	11 ^b	25(1/4)	50(2/4)	33	50(1/2)

a,b,c,d,e: p<0,05

Tabla 3 (G1+G2)

	Grupo A			Grupo B			Grupo C		
	T. gest %	T. impl %	T.mult %	T. gest %	T. impl %	T.mult %	T. gest %	T. impl %	T.mult %
0G1+G2	80(4/5)	40	25(1/4)	25(1/4)	17	100(1/1)	0(0/5)	-	0
1G1+G2	33(2/6)	11	0(0/2)	36(4/11)	18	50(2/4)	50(4/8)	12	25(1/4)
2G1+G2	66(12/18)	26	25(3/12)b	33(3/9)	17	0	67(4/6)	25(1/4)	
3G1+G2	65(56/86)	40a	66(37/56)b	52(26/50)	26a	42(11/26)	42(10/24)	50(5/10)	

a,b: p(0.05)

CONCLUSIONES

En pacientes jóvenes (grupo A), la tasa de gestación es similar cuando se transfieren 2 ó 3 embriones de buena calidad (G1+G2). Sin embargo, la tasa de implantación tiende a aumentar cuando se transfieren 3 embriones y sí encontramos diferencias significativas en la tasa de embarazos múltiples entre estos dos grupos.

Concluimos que sería interesante hacer un estudio prospectivo en el que se transfirieran 2 versus 3 embriones en este grupo de pacientes jóvenes.

Resultados de la transferencia embrionaria en día 2 vs. día 3

Luna M, Coroleu B, Barri P N, Veiga, A

Institut Universitari Dexeus

INTRODUCCIÓN

El objetivo del estudio es determinar si el hecho de retardar la transferencia embrionaria de Día 2 a Día 3 (se considera Día 0 el día de la punción folicular), permite elegir por características morfológicas embriones en un estado de desarrollo más avanzado, y que por tanto tienen un mejor pronóstico evolutivo. Con esto se pretende incrementar la tasa de embarazo y de implantación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realiza un estudio prospectivo y randomizado con las pacientes del programa de FIV del Institut Universitari Dexeus desde julio a septiembre de 2000. Se incluyen en el estudio 152 pacientes (73 en el grupo de Día 2 y 79 en el grupo de Día 3). Las pacientes con al menos un oocito fecundado en Día 1 se randomizan para la transferencia en Día 2 o en Día 3.

Los embriones se cultivan en IVF (Scandinavian IVF Science, Sweden), que son medios sin aminoácidos. Se trabaja con placas de 4 pocillos, y siempre se pone aceite (Ovoil, Scandinavian IVF Science, Sweden).

Los cinco incubadores del laboratorio tienen filtros CODA (gen X International), y en el laboratorio hay torres CODA para filtrar el aire.

El análisis estadístico se realiza con el programa SPSS (Chicago, IL, USA), con un nivel de significación $p=0,05$.

RESULTADOS

La tasa de embarazo por transferencia es mayor en Día 2 (53,4%) que en Día 3 (38%), pero la diferencia no estadísticamente significativa ($p=0,056$).

La tasa de implantación también es más elevada en Día 2 (32,53%) que en Día 3 (20,83%), siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p=0,033$).

En aquellas pacientes en que no podemos elegir los embriones a transferir, dado el bajo número de embriones disponibles (debido a una mala respuesta, o a una baja tasa de fecundación), la tasa de embarazo por transferencia es significativamente más elevada en el grupo de Día 2 (57,7%) que en el de Día 3 (28%) ($p=0,032$).

El porcentaje de embriones óptimos en Día 2 (embriones de 4 células o más, simétricas y con menos del 10% de fragmentación) es del 70,2 %, y en Día 3 (embriones de 6 células o más, simétricas y con menos del 10 % de fragmentación) es del 50,34%. La diferencia entre los dos grupos es estadísticamente significativa ($p=0,000$).

CONCLUSIONES

A la vista de estos resultados creemos que alargar el cultivo puede perjudicar a los embriones, y hace que se implanten menos, dando una peor tasa de embarazo y de implantación. Por tanto, la mejoría que supondría el hecho de poder transferir embriones en un estado evolutivo más avanzado, se ve contrarrestada porque el cultivo perjudica a los embriones. Como consecuencia, creemos que con la metodología seguida en el Institut Universitari Dexeus, es mejor transferir en Día 2 para obtener mejores resultados, e investigar en nuevos medios de cultivo que permitan mantener los embriones en mejores condiciones.

Es posible que el hecho de que el medio de cultivo no contenga aminoácidos, perjudique al embrión en el paso de 4 a 8 células (Día 3), ya que en ese momento el embrión activa su genoma, y necesitaría los aminoácidos para sintetizar proteínas.

Transferencia en día 3: ¿podemos congelar en día 2?

Bonada M, Vendrell J, Torres M, Roses A, Marqueta J

Instituto Balear de Infertilidad. Palma de Mallorca

INTRODUCCIÓN

Desde que introducimos la transferencia en D+3, observamos un aumento significativo en el porcentaje de embarazo (41,9% vs. 29,5%; $p < 0,05$), pero también una disminución en la supervivencia de los embriones congelados en D+3. Para intentar mejorar los resultados de la congelación nos planteamos encontrar una posible relación entre los embriones en D+2 y D+3 con el fin de seleccionar embriones para congelar en D+2 sin comprometer la transferencia en D+3.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio incluye 188 ciclos de FIV con transferencia en D+3 que se realizaron de enero a diciembre de 2000. Se analizaron retrospectivamente un total de 1040 embriones con una fragmentación (20%). Se definieron 3 grupos de estudio en D+3:

1. Embriones "óptimos" para transferir ((8 células y (100% de división respecto a D+2)
2. Embriones "aceptables" para transferir ((6 células y (50% de división respecto a D+2)
3. Embriones que no reúnen los requisitos anteriores

RESULTADOS

El análisis de los resultados muestra que el porcentaje de embriones "aceptables" para transferir en D+3 es significativamente mayor cuando proceden de embriones de 4 células frente a embriones de < 4 células o > 4 en D+2 (85,1% vs. 30,4%, y 48,1% respectivamente; $p < 0,0001$). Asimismo, el porcentaje de embriones "óptimos" para transferir en D+3 también es significativamente mayor cuando proceden de embriones de 4 células frente a embriones de < 4 células o > 4 en D+2 (51,9% vs. 11,2%, y 21,0% respectivamente; $p < 0,0001$).

CONCLUSIONES

El número de células en D+2 podría considerarse como valor predictivo del desarrollo embrionario en D+3, y resultaría determinante respecto a la congelación, o no, de los embriones en D+2 sin comprometer la transferencia en D+3.

¿Predice la selección de embriones el éxito de una transferencia?

Scheffer R, Cabañes I, Mínguez Y, Aragonés M, Herrer R, García-Velasco J A, Simón C.

IVI-Madrid

OBJETIVO

Estudiar la importancia de la selección de los embriones a transferir en las tasas de implantación y embarazo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo de 273 ciclos de Reproducción Asistida realizados en el IVI-Madrid en el año 2000, en los que se transfirieron 3 embriones en día dos o tres de desarrollo. Los ciclos se dividieron en tres grupos, en función del procedimiento realizado: 151 de ICSI, 75 de FIV-ICSI y 47 de FIV. Dentro de cada grupo se compararon las tasas de gestación e implantación entre pacientes que congelaron embriones (selección de embriones a transferir) y las que no (no selección).

RESULTADOS

ICSI	n	Edad media	Tasa de implantación	% de embarazo
0 embriones congelados	65	35	17,51	38,46
> 1 embrion congelado	86	33	28,52	56,98
FIV-ICSI	n	Edad media	Tasa de implantación	% de embarazo
0 embriones congelados	16	33	17,65	37,5
> 1 embrion congelado	59	34	32,8	61,02
FIV	n	Edad media	Tasa de implantación	% de embarazo
0 embriones congelados	24	36	28	58,33
> 1 embrion congelado	23	33	24,64	52,17

CONCLUSIONES

- No se encuentran diferencias entre las tasas de gestación e implantación de los tres grupos (FIV, ICSI y FIV/ICSI).
- Cuando se pueden seleccionar los embriones a transferir en el grupo de ICSI y FIV/ICSI, las tasas de gestación e implantación son significativamente superiores.
- En el grupo del FIV, las diferencias no son significativas, debido probablemente al tamaño muestral limitado y a la heterogeneidad en cuanto a la etiología de las pacientes en este grupo.

Influencia de la selección de los embriones en el programa de criopreservación

Martínez M, Andrés L, Cuadros Fernández J, Peramo B, Ricciarelli E, Hernández E R.

Clínica Madrid-FIV, CSIC.

INTRODUCCIÓN

La criopreservación de embriones es una técnica de uso común y obligada en un laboratorio de FIV. Es conocido el impacto negativo que esta técnica tiene sobre la capacidad de supervivencia del embrión humano, que se traduce en unas tasas de gestación de aproximadamente el 14 %. Dos son las causas más admitidas de este fracaso: la mecánica de los criopreservantes y la calidad de los embriones que se congelan. Dado que estas dos variables pueden afectar negativamente en los resultados de un programa de congelación, Madrid FIV pone un especial interés tanto en la optimización de los protocolos de congelación/descongelación como en la realización de una selección rigurosa de los embriones a congelar. Actualmente hemos incluido como criterio de selección de embriones la ausencia de blastómeras multinucleadas (MNBs) ya que hemos observado alteraciones cromosómicas importantes mediante hibridación in situ fluorescente (FISH) en estos embriones. En el presente estudio tratamos de determinar el efecto de las citadas modificaciones sobre la tasa de gestación en estos ciclos con criotransferencia de embriones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 13 ciclos de descongelación cuyos embriones fueron congelados tras una selección que incluye la ausencia de MNBs. Los resultados fueron comparados con los obtenidos en 44 ciclos de descongelación realizados antes de introducir este criterio en la selección. La congelación/descongelación se realizó utilizando medios comerciales (Vitrolife) modificando en el protocolo estándar el tiempo de permanencia de los embriones en medio Embryo Freezing Solution 2 (10 minutos). Los estudios de FISH se realizaron con embriones que presentaban más de una MNB en día 2º y/o día 3º. Fueron biopsiados utilizando tyrode ácido, fijados con Carnoy (3:1 Metanol/acético) y analizados mediante FISH utilizando sondas para detección de cromosomas X e Y (CEP X SpectrumOrange/Y SpectrumGreen Direct Labeled Fluorescent DNA Probe Kit). De cada embrión extrajimos al menos una blastómera multinucleada y otra en la que se observaban núcleos únicos o el núcleo no era evidente.

RESULTADOS

Desde la fecha en la que se incluyó la ausencia de MNBs como criterio de selección de embriones a congelar, se realizaron 13 ciclos de descongelación, de los cuales 5 resultaron en embarazos clínicos (38,5%), mientras que en el grupo control se realizaron 44 ciclos de descongelación, de los que 11 dieron lugar a embarazos clínicos (25%). En los embriones multinucleados estudiados por FISH encontramos diferentes tipos de aneuploidías en un 86% de las blastómeras estudiadas.

CONCLUSIONES

Aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas en la tasa de embarazos clínicos en los dos grupos analizados, debido fundamentalmente al bajo número de ciclos estudiados, parece evidente que la tasa de embarazo en los ciclos de criotransferencia de embriones seleccionados por la ausencia de MNBs ha aumentado. Pensamos que evitar la congelación de embriones con MNBs es un criterio positivo, ya que está demostrado que estos embriones tienen menos probabilidades de desarrollo y que, como hemos podido comprobar en nuestro estudio, poseen alteraciones cromosómicas importantes.

Un nuevo parámetro de selección embrionaria: blastómeras multinucleadas

Cuadros Fernández J, Andrés L, Martínez M, Peramo B, Ricciarelli E, Hernández E R

Clínica Madrid FIV, CSIC

INTRODUCCIÓN

La presencia de blastómeras multinucleadas (MNBs) ha sido relacionada con una disminución en las tasas de gestación. En MadridFIV, además de los criterios conocidos de tasa de fragmentación, número y regularidad de las células, se ha incluido la ausencia de MNBs como un parámetro para la selección de los embriones a transferir. Los objetivos del presente trabajo son: 1) comparar las tasas de gestación y de implantación embrionaria utilizando la ausencia de MNBs como criterio de selección, 2) determinar las tasas de gestación y de implantación en ciclos con >15% de los embriones con MNBs y 3) valorar la evolución de los embriones con MNBs en cultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron 112 ciclos con transferencia. Las pacientes fueron divididas en 2 grupos según el número de embriones con MNBs: 53 ciclos correspondieron al grupo con >15% de embriones con MNBs y 59 ciclos al grupo con <15% de embriones con MNBs. Sólo se transfirieron embriones en los que no se observaron MNBs.

RESULTADOS

En los 112 ciclos estudiados, la tasa de gestación fue del 50%, mientras que en 421 ciclos realizados en el periodo anterior a la selección de embriones por la ausencia de MNBs fue del 39%. La diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Por otra parte, la tasa de implantación embrionaria también fue superior (27% vs 21% respectivamente). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las tasas de gestación del grupo con >15% de embriones con MNBs (50,9%) vs las del grupo con <15% de embriones con MNBs (49,2%). Las tasas de embarazo en ambos grupos mostraron una correlación similar con la edad de las pacientes. Las tasas de implantación de los embriones en las mujeres embarazadas fue de 57,8% en el grupo con <15% de embriones con MNBs y de 57,4% en el grupo con >15% de embriones con MNBs. Por otro lado, el 87% de los embriones que presentaban MNBs detuvieron su desarrollo en cultivo antes del día 5º y todos los que llegaron a blastular mostraron anomalías morfológicas, ya sea a nivel de la masa celular interna o a nivel del trofoblasto. Comparativamente, el 52% de los embriones en los que no se observaron MNBs alcanzaron el estadio de blastocisto.

CONCLUSIONES

La exclusión de embriones con MNBs en la transferencia embrionaria ha sido determinante para el aumento de la tasa de embarazos. Por otra parte, no encontramos diferencias significativas entre las tasas de embarazo y de implantación embrionaria en los ciclos que presentan >15% de embriones con MNBs, comparados con los ciclos en los que no se observan estos embriones anormales. Una posible explicación a estos resultados sería que en nuestro centro estamos realizando una búsqueda exhaustiva de los embriones con MNBs, para evitar su transferencia, de tal manera que la selección realizada nos ha permitido escoger los embriones de calidad óptima, como demuestran las tasas de implantación en las mujeres embarazadas.

Transferencia de blastocistos criopreservados tras 24 horas de cultivo. Influencia en la tasa de embarazo e implantación

Torelló M J, Luna M, Hugas M, PN. Barri P N, Veiga A

Servicio de Medicina de la Reproducción. Departamento de Obstetricia y Ginecología.
Institut Universitari Dexeus.

INTRODUCCIÓN

Determinar la supervivencia de un blastocisto tras un proceso de descongelación es complejo, ya que la mayoría sufren una retracción debido a la pérdida del líquido de la cavidad blastocélica, haciendo difícil la valoración de la morfología post descongelación. Es necesario mantener el blastocisto en cultivo durante tres horas, como mínimo, para que el blastocele recupere su tamaño inicial y poder observar la reexpansión del embrión. Transcurrido este periodo de tiempo todavía hay blastocistos que permanecen colapsados impidiendo la valoración de la supervivencia. El objetivo de este estudio es valorar si prolongando hasta 24 horas el tiempo de cultivo, favorece la total reexpansión del blastocisto antes de la transferencia y comporta un aumento de la tasa de embarazo/transferencia que, con un periodo de 3 horas de cultivo es del 15% (datos Institut Dexeus año 1999).

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio retrospectivo de 40 pacientes que realizaron un ciclo de criotransferencia de embriones en estadio de blastocisto durante el periodo Septiembre 2000 a Mayo 2001. La media de edad de las pacientes era de 36.1 años. Los medios utilizados para la descongelación fueron Thaw Kit-1 (Scandinavian IVF Science) y siguiendo el protocolo de extracción lenta del crioprotector. Se realizó la transferencia de los blastocistos que, tras 24 horas de cultivo in vitro, lograron expandirse.

RESULTADOS

Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Pacientes (X edad)	40 (36,1)
Blastocistos descongelados	87
Blastocistos transferidos	37
Tasa supervivencia	42,5%
Transferencias(% Pacientes)	24 (60%)
X Blastocistos/Transferencia	1,5
Embarazos	7
Tasa embarazo/Paciente	17,5%
Tasa embarazo/Transferencia	29,2%
Tasa implantación	(8/37) 21,6%

CONCLUSIONES

Prolongar el período de cultivo post descongelación permite, valorar con mas precisión la capacidad de reexpansión de los blastocistos que han superado el proceso, obteniéndose una tasa de embarazo/transferencia de 29.2%, superior a la obtenida con el cultivo corto (3 horas).

A pesar de los esfuerzos por conseguir un buen protocolo para la congelación y descongelación de embriones en estadio de blastocisto, la tasa de supervivencia sigue siendo baja (42,5%) ya que es inferior a la que se obtiene en estadio de células 64% (datos Institut Dexeus año 1999).

Mejora de las condiciones de cultivo embrionario

Prados F, Gálvez G, Bruna I

Unidad de Medicina de la Reproducción. Hospital de Madrid-Montepríncipe.

INTRODUCCIÓN

La fecundación in vitro (FIV) implica el manejo de unas delicadas células como son los ovocitos y los blastómeros. Procesos tan complejos como la fecundación y las primeras etapas del desarrollo y la diferenciación embrionaria, requieren unas condiciones de cultivo finamente controladas. En los últimos años se ha conseguido mejorar la calidad del ambiente en el que se desarrollan los embriones. Esta mejora es la principal responsable del incremento observado en las tasas de embarazo por FIV.

En nuestro centro hemos realizado dos cambios simultáneos en el incubador de embriones. En el presente estudio se analiza la repercusión de dichos cambios en las tasas de embarazo e implantación embrionaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo de los datos correspondientes a nuestros casos de FIV.

Durante el periodo: marzo-2000 a febrero-2001 (ANTES), la concentración de CO₂ en el incubador fue del 5%. Desde marzo-2001 hasta mayo-2001 (DESPUÉS), se utilizó un 5,4% de CO₂ y se insertó un filtro "Coda in line" (GEN-X) en el conducto de entrada de CO₂ a la estufa.

RESULTADOS

	TOTAL	ANTES	DESPUÉS
Nº DE CICLOS	59	36	23
MEDIA DE EDAD (AÑOS)	34,7	35,1	34,1
MEDIA DE OVOCITOS OBTENIDOS	7,3	6,7	8,2
TASA DE FECUNDACIÓN (2PN)	58,4%	55,9%	62,2%
TASA DE ICSI	52,6%	47,1%	60,9%
EMBRIONES GRADOS 1 + 2 OBTENIDOS	74,3%	64,4%	85,6%
EMBRIONES POR TRANSFERENCIA	2,3	2,5	2,2
EMBRIONES G1+2 TRANSFERIDOS	76,8%	75,0%	79,2%
DÍA DE TRANSFERENCIA	2,7	2,6	2,8
EMBARAZOS / TRANSFERENCIA	33,0%	19,2%	50,0%
TASA DE IMPLANTACIÓN	19,6%	9,4%	33,3%
EMBARAZOS MÚLTIPLES	31,3%	20,0%	36,4%
TRANSFERENCIAS POR PUNCIÓN	80,0%	70,3%	95,7%

CONCLUSIONES

1/ Los resultados sugieren que la instalación del filtro "Coda in line" y la subida del nivel de CO₂ en el incubador han causado un significativo incremento en las tasas de embarazo e implantación embrionaria.

2/ La transferencia de embriones de buena calidad morfológica no garantiza un elevado porcentaje de embarazo.